

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002842

International filing date: 16 February 2005 (16.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-232961
Filing date: 10 August 2004 (10.08.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

16.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 8月10日
Date of Application:

出願番号 特願2004-232961
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP2004-232961]

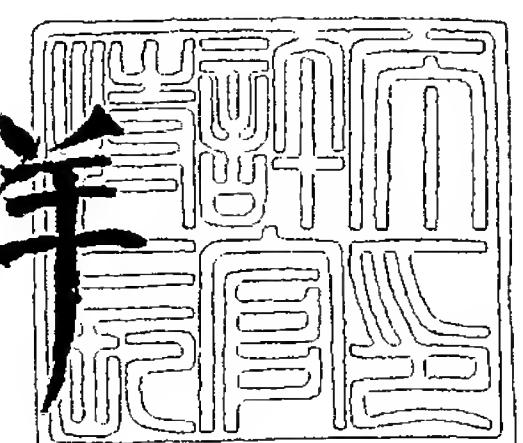
出願人 山中伸弥
Applicant(s):
住友製薬株式会社

2005年 3月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 133279
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 01/02
C12N 05/06
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝2-9-7-1401
【氏名】 山中 伸弥
【特許出願人】
【識別番号】 501219312
【氏名又は名称】 山中 伸弥
【特許出願人】
【識別番号】 000183370
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100121588
【弁理士】
【氏名又は名称】 五十部 穂
【電話番号】 06-6466-5214
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004- 42337
【出願日】 平成16年 2月19日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056546
【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0205876

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の（a）および（b）の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

（a）ECA T遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 2】

ECA T遺伝子が、ECA T 1 遺伝子、ECA T 2 遺伝子、ECA T 3 遺伝子、ECA T 4 遺伝子、ECA T 5 遺伝子、ECA T 6 遺伝子、ECA T 7 遺伝子、ECA T 8 遺伝子、ECA T 9 遺伝子およびOct 3/4 遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項1または2記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】

体細胞が、ECA T遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞である、請求項1～3いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

体細胞が、ECA T遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項4記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】

ECA T遺伝子がECA T 1 遺伝子、ECA T 2 遺伝子、ECA T 3 遺伝子、ECA T 4 遺伝子、ECA T 5 遺伝子、ECA T 6 遺伝子、ECA T 7 遺伝子、ECA T 8 遺伝子、ECA T 9 遺伝子およびOct 3/4 遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項4または5記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T 2 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 8】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T 3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 9】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T 5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 10】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T 2 遺伝子およびECA T 3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項11】

ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項10記載のスクリーニング方法。

【請求項12】

体細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項7～11いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項13】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項14】

体細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する体細胞である、請求項13記載のスクリーニング方法。

【請求項15】

請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質。

【請求項16】

ES細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、請求項15記載の核初期化物質。

【請求項17】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用。

【請求項18】

ノックインマウスが、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項17記載の使用。

【請求項19】

ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項17または18記載の使用。

【請求項20】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項17～19いずれか記載の使用。

【請求項21】

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞。

【請求項22】

ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項21記載の体細胞。

【請求項23】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項21または22記載の体細胞。

【請求項24】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請求項21～23いずれか記載の体細胞。

【請求項25】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、請求項24記載の体細胞。

【請求項26】

以下の(a)および(b)の工程を含む、E S様細胞の選択方法：

(a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をE S様細胞として選択する工程。

【請求項27】

E C A T 遺伝子が、E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子およびOct 3/4 遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項26記載の選択方法。

【請求項28】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項26または27記載の選択方法。

【請求項29】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項26記載の選択方法：

(a) E C A T 2 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をE S様細胞として選択する工程。

【請求項30】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項26記載の選択方法：

(a) E C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をE S様細胞として選択する工程。

【請求項31】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項26記載の選択方法：

(a) E C A T 5 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をE S様細胞として選択する工程。

【請求項32】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項26記載の選択方法：

(a) E C A T 2 遺伝子およびE C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をE S様細胞として選択する工程。

【請求項33】

E C A T 2 遺伝子およびE C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、請求項32記載の選択方法。

【請求項34】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項26記載の選択方法：

(a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程。

【請求項35】

請求項21～25いずれか記載の体細胞の、請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法または請求項26～34いずれか記載の選択方法における使用。

【請求項36】

請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは請求項26～34いずれか記載の選択方法において選択されたES様細胞。

【請求項37】

以下の(a)および(b)の工程を含む、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項38】

ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項37記載のスクリーニング方法。

【請求項39】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項37または38記載のスクリーニング方法。

【請求項40】

ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞である、請求項37～39いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項41】

ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、請求項40記載のスクリーニング方法。

【請求項42】

ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項40または41記載のスクリーニング方法。

【請求項43】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項44】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる

工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項45】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項46】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項47】

ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項46記載のスクリーニング方法。

【請求項48】

ES細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、請求項43～47いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項49】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項50】

ES細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するES細胞である、請求項49記載のスクリーニング方法。

【請求項51】

請求項37～50いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択されるES細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項52】

フィーダー細胞の分泌産物である、請求項51記載のES細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項53】

血清由来成分である、請求項51記載のES細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項54】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項37～50いずれか記載のスクリーニング方法において用いるES細胞の供給源としての使用。

【請求項55】

ノックインマウスが、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項54記載の使用。

【請求項56】

ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT

4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項54または55記載の使用。

【請求項57】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項54～56いずれか記載の使用。

【請求項58】

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞。

【請求項59】

ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項58記載のES細胞。

【請求項60】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項58または59記載のES細胞。

【請求項61】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請求項58～60いずれか記載のES細胞。

【請求項62】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、請求項61記載のES細胞。

【請求項63】

請求項58～62いずれか記載のES細胞の、請求項37～50いずれか記載のスクリーニング方法における使用。

【書類名】明細書

【発明の名称】体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、体細胞核初期化物質の新規なスクリーニング方法に関する。より詳細には、本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、体細胞からES様細胞への変換を誘導する物質（体細胞の核初期化（Nuclear reprogramming）を誘導する物質）を効率的に同定する方法に関する。また本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES様細胞を効率的に選択する方法に関する。さらに本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES細胞の未分化・多能性維持（ES細胞としての状態維持）をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES細胞の未分化・多能性維持物質を効率的に選択する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

胚性幹細胞（ES細胞）は哺乳動物胚盤胞の内部細胞塊より樹立した幹細胞であり、すべての細胞へと分化する能力（分化多能性）を維持したまま、無限に増殖させることができる。この特性から、ES細胞から大量合成した心筋細胞や神経細胞を心筋梗塞やパーキンソン病患者に移植して治療する幹細胞療法が期待されている。しかしES細胞にはヒト受精卵を利用し、犠牲にするという致命的とも言える倫理的問題が存在する。一方、生体の各組織には神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞などの組織幹細胞が存在する。組織幹細胞は受精卵を使わないので倫理的問題が無く、また患者自身の細胞を使えるので拒絶反応も回避することができる。しかし組織幹細胞は単離が難しく、増殖能や分化能もES細胞に比べると比べものにならないほど限られている。組織幹細胞や分化細胞等の体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。具体的には、例えば患者の体細胞を採取し、これを核初期化因子（核初期化を誘導する因子）で刺激してES様細胞に変換し、これを幹細胞として臨床応用することが期待される。しかしながら、そのような核初期化因子の探索を効率良く行える系は存在していない。

【0003】

ECAT遺伝子（ES cell associated transcript gene）は、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。これまでにECAT遺伝子として報告されているものとしては、転写因子Oct3（Oct4、POU5f1とも呼ばれる。以下Oct3/4という）遺伝子が知られている。また、同様な遺伝子がヒトでも報告されているが（hOct3/4遺伝子；非特許文献1を参照）、hOct-3/4遺伝子についてはES細胞特異的な発現を証明したという報告はない。

【0004】

近年我々のグループは、ESTデータベースを利用したコンピューター解析およびノザンプロット解析に基づき、ES細胞で特異的に発現する9個の遺伝子を見出し、これをECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、およびECAT9遺伝子と命名した（特許文献1を参照）。このうちECAT4はNanogとも呼ばれる因子であり、ES細胞が有する全能性（分化多能性）の維持に必須の因子であることが明らかとなった（非特許文献2を参照）。またECAT5はERasとも呼ばれる因子であり、ES細胞の増殖を促進する因子であることが明らかになっている（非特許文献3を参照）。

【0005】

またECAT3はF-box含有タンパクの1種、Fbx15であり、F-boxを有することからユビキチンリガーゼであると考えられている。ECAT3遺伝子の発現調節領域を解析した結果、ES細胞特異的転写因子であるOct4とSox2の2つにより協調的に発現調節を受けていることが明らかとなった（非特許文献4を参照）。

ECAT3の機能を調べるために、ECAT3遺伝子のコーディング領域に β geo（ β ガラクトシ

ダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）をノックインして作製したノックインマウスを解析した結果、当該マウスには明らかな異常が認めらず、またホモ変異ES細胞にも増殖や分化能において明らかな異常は認められなかった。このことからECAT3遺伝子は、ES細胞の維持や増殖にとって必須の因子ではないと考えられている（非特許文献4を参照）。

【0006】

【特許文献1】WO 02/097090 号公報

【非特許文献1】Takeda et al., Nucleic Acids Research, 20:4613-4620(1992)

【非特許文献2】Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)

【非特許文献3】Takahashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003)

【非特許文献4】Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、ECAT遺伝子を利用し、ES類似細胞を効率良く選択するシステムと、同システムを利用した体細胞（組織幹細胞、分化細胞）の核初期化物質のスクリーニング法を提供することにある。また本発明の別の目的は、ECAT遺伝子を利用した、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前述のように、体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。本発明者はこのようなES様細胞への変換を誘導する物質（体細胞の核初期化物質）を効率的にスクリーニングすることの可能な方法につき鋭意検討した。

【0009】

本発明者はまず、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製した。具体的には、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子である β geo遺伝子をノックインしたノックインマウスから体細胞（リンパ球）を調製した。この体細胞をES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、全て死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。一方、前記体細胞を正常ES細胞と融合し、ES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、生存細胞が出現した。この生存細胞を解析した結果、ECAT4やOct3/4を発現し、ES細胞としての性質を有するES様細胞であることが分かった。以上の実験結果より、体細胞とES細胞との融合により体細胞の核が初期化（リ프로그ラミング）されたためにES様細胞が出現し、そしてECAT3遺伝子に置き換えられた β geoが発現して薬剤耐性となったことが明らかとなった。

【0010】

以上のようにECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞は、ES様細胞に変換された時にのみ、マーカー遺伝子を発現する。すなわちES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができる。この性質を利用すれば、体細胞からES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を、薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現を指標として効率的にスクリーニングすることができる。また同様に、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を効率的に選択することができる。

本発明者らはさらに、ECAT3のみならず、ECAT2やECAT5等の他のECATに関しても、前記スクリーニングやES様細胞の選択に利用できることを見出した。ECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）はいずれもES細胞で特異的に発現する遺伝子であることが知られているため、いずれのECATについても前記のスクリーニングに用いることができる。特に、ECAT遺伝子をノックイン等の手法により破壊する場合には、

ES細胞の維持や増殖において必須ではないECAT2およびECAT3が非常に有効に利用される。

【0011】

さらに「ES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターする」という前記システムは、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニングにも応用することができる。マウスES細胞はサイトカインLIFにより未分化・多能性が維持できる。さらに細胞数が多いときはLIFを添加した無血清培地によりフィーダー細胞を用いずに維持することができる。しかし低密度では血清もしくはフィーダー細胞が必須である。これは血清やフィーダー細胞の分泌産物にLIF以外のES細胞維持因子が含まれることを示す。またヒトES細胞もマウスフィーダー細胞上で一部の細胞は未分化・多能性が維持されるが、全ての細胞を未分化状態で維持することはできない。さらにマウスES細胞と異なりヒトES細胞ではLIFは無効である。これはやはり、フィーダー細胞がLIF以外のES細胞未分化・多能性維持因子を分泌することを示唆すると同時に、フィーダー細胞分泌産物とも異なる更なる因子の必要性を示唆している。ヒトES細胞を臨床応用する場合、動物血清やフィーダー細胞を用いずに培養することが必須であり、ES細胞の未分化・多能性維持因子の同定が求められている状況にあるが、効率的な同定法は未だ見出されていない。

本発明の前記システムによれば、ES細胞状態を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができるため、例えばES細胞状態を維持できない培養条件下に被験物質を添加し、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べることにより、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質を容易にスクリーニングすることができる。

本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0012】

すなわち本発明は、下記に掲げるものである：

(1) 以下の(a)および(b)の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(2) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(1)記載のスクリーニング方法、

(3) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(1)または(2)記載のスクリーニング方法、

(4) 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞である、前記(1)～(3)いずれか記載のスクリーニング方法、

(5) 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記(4)記載のスクリーニング方法、

(6) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(4)または(5)記載のスクリーニング方法、

【0013】

(7) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(1)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(8) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(9) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(10) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2 遺伝子および ECAT3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(11) ECAT2 遺伝子と ECAT3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記 (10) 記載のスクリーニング方法、

(12) 体細胞が、ECAT 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記 (7) ~ (11) いずれか記載のスクリーニング方法、

(13) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(14) 体細胞が、ECAT 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する体細胞である、前記 (13) 記載のスクリーニング方法、

【0014】

(15) 前記 (1) ~ (14) いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質、

(16) ES 細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、前記 (15) 記載の核初期化物質、

【0015】

(17) ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、前記 (1) ~ (14) いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用、

(18) ノックインマウスが、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記 (17) 記載の使用、

(19) ECAT 遺伝子が ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (17) または (18) 記載の使用、

(20) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記 (17) ~ (19) いずれか記載の使用、

【0016】

(21) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞、

(22) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(21)記載の体細胞、

(23) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(21)または(22)記載の体細胞、

(24) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、前記(21)～(23)いずれか記載の体細胞、

(25) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、前記(24)記載の体細胞、

【0017】

(26) 以下の(a)および(b)の工程を含む、ES様細胞の選択方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、

(27) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(26)記載の選択方法、

(28) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(26)または(27)記載の選択方法、

(29) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(30) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(31) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(32) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(33) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、前記(32)記載の選択方法、

(34) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(35) 体細胞が、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有する体細胞である、前記(26)～(34)いずれか記載の選択方法、

(36) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(35)記載の選択方法、

【0018】

(37) 前記(21)～(25)いずれか記載の体細胞の、前記(1)～(14)いずれか記載のスクリーニング方法または前記(26)～(36)いずれか記載の選択方法における使用、

(38) 前記(1)～(14)いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは前記(26)～(36)いずれか記載の選択方法において選択されたES様細胞、

【0019】

(39) 以下の(a)および(b)の工程を含む、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(40) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(39)記載のスクリーニング方法、

(41) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(39)または(40)記載のスクリーニング方法、

(42) ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞である、前記(39)～(41)いずれか記載のスクリーニング方法、

(43) ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、前記(42)記載のスクリーニング方法、

(44) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(42)または(43)記載のスクリーニング方法、

(45) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(46) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(47) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(48) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(49) ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記(48)記載のスクリーニング方法、

(50) ES細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、前記(45)～(49)いずれか記載のスクリーニング方法、

(51) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(52) ES細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するES細胞である、前記(51)記載のスクリーニング方法、

【0020】

(53) 前記(39)～(52)いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択されるES細胞の未分化・多能性維持物質、

(54) フィーダー細胞の分泌産物である、前記(53)記載のES細胞の未分化・多能性維持物質、

(55) 血清由来成分である、前記(53)記載のES細胞の未分化・多能性維持物質、

【0021】

(56) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、前記(39)～(52)いずれか記載のスクリーニング方法において用いるES細胞の供給源としての使用、

(57) ノックインマウスが、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記(56)記載の使用、

(58) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(56)または(57)記載の使用、

(59) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(56)～(58)いずれか記載の使用、

【0022】

(60) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞、

(61) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(60)記載のES細胞、

(62) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(60)または(61)記載のES細胞、

(63) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、前記(60)～(62)いずれか記載のES細胞、

(64) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、前記(63)記載のES細胞、ならびに

(65) 前記(60)～(64)いずれか記載のES細胞の、前記(39)～(52)いずれか記載のスクリーニング方法における使用、に関する。

【発明の効果】

【0023】

本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法は、ES様細胞を効率良く選択できる方法であり、また体細胞の核初期化物質を効率的に同定できる方法である。核初期化物質は、幹細胞療法を現実化するために極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのような核初期化物質の早期発見が可能となる。さらに本発明のES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法は、ES細胞未分化・多能性維持物質を効率的に同定できる方法である。当該物質はES細胞の臨床応用において極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのようなES細胞未分化・多能性維持物質の早期発見が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定[IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

【0025】

本明細書において「ECAT遺伝子(ES cell associated transcript gene)」とは、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子、Oct3/4遺伝子が挙げられる(WO 02/097090号公報)。本明細書において「ECAT遺伝子」という用語を用いる場合、技術内容に応じて、ECATのcDNA(mRNA)のみならず、ECATのゲノムDNAを指す場合もある。

これらECAT cDNAのマウス型・ヒト型の塩基配列およびアミノ酸配列についてはWO 02/097090号公報に記載されている。本明細書の配列表においては、以下の配列番号に示される。

【0026】

【表1】

ECAT遺伝子	マウス型塩基配列	マウス型アミノ酸配列	ヒト型塩基配列	ヒト型アミノ酸配列
ECAT1	配列番号:1	配列番号:2	配列番号:3	配列番号:4
ECAT2	配列番号:5	配列番号:6	配列番号:7	配列番号:8
ECAT3	配列番号:9	配列番号:10	配列番号:11	配列番号:12
ECAT4	配列番号:13	配列番号:14	配列番号:15	配列番号:16
ECAT5	配列番号:17	配列番号:18	配列番号:19	配列番号:20
ECAT6	配列番号:21	配列番号:22		
ECAT7	配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26
ECAT8	配列番号:27	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30
ECAT9	配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33	配列番号:34
Oct3/4	配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38

【0027】

「ECAT遺伝子」（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）の範疇には、前記配列番号に示した塩基配列を含有する遺伝子のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらの塩基配列に類似の塩基配列を含有する遺伝子も含まれる。

【0028】

ここで「類似の塩基配列を含有する遺伝子」とは、前記配列番号に示される塩基配列中、1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含有する遺伝子や、前記配列番号で示される塩基配列と高い相同意を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。

ここで「高い相同意を有する塩基配列を含有する遺伝子」とは、各ECAT遺伝子とストリジエントな条件でハイブリダイズする遺伝子を意味し、具体的には前記配列番号で示された塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同意を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。ここでストリジエントな条件とは、ハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができ、所望の相同意に応じて設定されるが、例えば塩濃度：6×SSC、温度：65℃の条件が挙げられる。

【0029】

また「ECAT」（ECAT1、ECAT2、ECAT3、ECAT4、ECAT5、ECAT6、ECAT7、ECAT8、ECAT9およびOct3/4）の範疇には、前記配列番号に示したアミノ酸配列を含有するタンパク質のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらのアミノ酸配列に類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質も含まれる。

ここで「類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、前記類似の塩基配列を含有する遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。

【0030】

本発明のスクリーニング方法は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞をスクリーニング用細胞として使用し、当該細胞に被験物質を接触させ、体細胞がES様細胞に変換されたことをマーカー遺伝子発現細胞の出現の有無でモニターすることにより、体細胞の核初期化物質（ES様細胞への変換物質）を効率的に同定する方法である。以下、本方法について具体的に説明する。

【0031】

(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程：

- (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法を提供する。

【0032】

前記で「ECAT遺伝子」とは、具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子が挙げられる。ここで「1または2以上」とは、具体的には1または2~3個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられ、好ましくは1個のECAT遺伝子、または2個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられる。具体的にはECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、またはこれらECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせが例示される。

前記ECAT遺伝子は、マウス、ラット、ヒト、サル等如何なる種由来のECAT遺伝子であっても良いが、好ましくはマウス、ヒト由来のECAT遺伝子が挙げられる。

【0033】

前記で「マーカー遺伝子」とは、当該マーカー遺伝子を細胞に導入することにより、細胞の選別や選択を可能とするような遺伝子全般を指す。具体的には薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。

【0034】

薬剤耐性遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子(neo)、テトラサイクリン耐性遺伝子(tet)、カナマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子(zeo)、ハイグロマイシン耐性遺伝子(hygro)等が挙げられる。各薬剤を含有する培地(選択培地という)で細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子が導入・発現した細胞のみが生き残る。従って、選択培地で細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子を含有する細胞を容易に選択することができる。

【0035】

蛍光タンパク質遺伝子としては、具体的にはGFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子、YFP(黄色蛍光タンパク質)遺伝子、RFP(赤色蛍光タンパク質)遺伝子、エクオリン遺伝子等が挙げられる。これら蛍光タンパク質遺伝子が発現した細胞は、蛍光顕微鏡で検出することができる。また蛍光強度の違いを利用することによりセルソーター等で分離・選択することや、細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、蛍光を発する細胞(ウエル)を蛍光顕微鏡下で検出することにより当該細胞を選択することができる。さらに、軟寒天培地などの上でコロニーを形成させ、蛍光顕微鏡下などでコロニーを選択することもできる。

【0036】

発光酵素遺伝子としては、具体的にはルシフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。これら発光酵素遺伝子を発現した細胞は、発光基質を加えて発光光度計で発光量を測定することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウエルから一部の細胞を採取し、発光基質を加えて発光光度計で発光の如何を測定することにより当該細胞を選択することができる。

【0037】

発色酵素遺伝子としては、具体的には β ガラクトシダーゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、アルカリリフォスファターゼ遺伝子、又は分泌型アルカリリフォスファターゼであるSEAP遺伝子等が挙げられる。これら発色酵素遺伝子が発現した細胞は、発色基質を加えて発色の有無を観察することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウエルから一部の細胞を採取し、発色基質を加えて発色の如何を観察することにより当該細胞を選択することができる。

【0038】

これらマーカー遺伝子の組み合わせに係る遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子 (neo) と β ガラクトシダーゼ遺伝子 (β -gal) との融合遺伝子である β geo 遺伝子が挙げられる。

【0039】

以上のようなマーカー遺伝子はいずれも当業者に周知であり、このようなマーカー遺伝子を含有するベクターはインビトロジェン社、アマシャムバイオサイエンス社、プロメガ社、MBL(医学生物学研究所)等から市販されている。

【0040】

前記マーカー遺伝子のうち、細胞の選択が容易であるという観点から、特に好ましいのは薬剤耐性遺伝子、または当該薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子である。

【0041】

前記において「体細胞」とは、ES細胞等の分化全能性細胞を除く全ての細胞を意味し、具体的には、(1) 神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2) 組織前駆細胞、または(3) リンパ球、上皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞等の分化した細胞が挙げられる。

【0042】

本発明のスクリーニング方法においては、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞を、スクリーニング用細胞として用いる。

ここで「発現調節領域」とは、遺伝子の発現(転写)を調節する領域のことであり、「プロモーター領域」、若しくは「プロモーター及びエンハンサー領域」を含む領域を意味する。

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法は、いろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカー遺伝子を存在させても良い。大別すると、(1-1) 個体(マウス)を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合と、(1-2) 個体を利用せずに細胞レベルでマーカー遺伝子を存在させる場合がある。以下に詳述する。

【0043】

(1-1) 個体(マウス)を利用してマーカー遺伝子を存在させる方法

個体(マウス)を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受けるゲノム上の位置にマーカー遺伝子を存在させる。この場合、ECAT遺伝子自身は、発現可能な形で存在していても良く、またECAT遺伝子が破壊された形で存在していても良い。

遺伝子の発現調節領域は、通常エクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、どのような位置に存在していても良い。

【0044】

(1-1-a) ECAT遺伝子を破壊する場合

ECAT遺伝子を破壊する方法は、当業者に周知の如何なる方法を用いても良いが、最も良く使われる手法としては、マーカー遺伝子を含有し、かつECAT遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター(以下ターゲッティングベクターと称する)を用いて、相同組換えにより当該ECAT遺伝子を標的破壊し、代わりにマーカー遺伝子をこの位置に存在させる方法が挙げられる。このようにECAT遺伝子を破壊し、その位置にマーカー遺伝子を存在させることを、「ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインする」と言う。

このようなマーカー遺伝子をノックインする方法は種々知られているが、中でもプロモータートラップ法が好適に用いられる。当該プロモータートラップ法は、プロモーターを持たないターゲッティングベクターを相同組換えによりゲノム中に挿入し、相同組換えが正しく起こった場合に内在性プロモーター(ECAT遺伝子プロモーター)によりマーカー遺伝子が発現するというものである。以下、当該プロモータートラップ法によりECAT遺伝子

発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法につき具体例を示す。

【0045】

まず、ターゲッティングに必要なECAT遺伝子のゲノム配列を決定する。当該ゲノム配列は、例えば公的データベースであるMouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>)等において既に公知である場合はこの配列情報を利用して配列決定することができる。また未知の場合は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35または37に記載のECAT遺伝子の一部をプライマーとして用い、当業者に入手可能なゲノムライブラリーをPCR法等でスクリーニングすることにより、所望のECAT遺伝子のゲノム領域を含有するゲノミッククローンを単離することや、ゲノム塩基配列を決定することができる。ここで用いるゲノムライブラリーとしては、例えばマウスBAC(bacterial artificial chromosome)ライブラリー (Invitrogen) やPAC(P1-derived artificial chromosome)ライブラリー (Invitrogen) 等が挙げられる。

【0046】

次に、前記で同定したECAT遺伝子のゲノムDNA配列に基づき、マーカー遺伝子と置き換えるECAT遺伝子ゲノム領域を決定する(以下、ECATゲノム領域Aと称する)。このECATゲノム領域Aを挟む5'側領域(5'アーム)と3'側領域(3'アーム)を、ゲノムDNAを鋳型としてPCRを行うことなどにより増幅する。ここで鋳型となるゲノムDNAとしては、ECAT遺伝子を含有するマウスBACクローンのゲノムDNA等が挙げられる。PCRのプライマーは前記ECAT遺伝子ゲノムDNAの配列に基づき設計することができる。増幅した5'アームおよび3'アームを、プロモータートラップ用ターゲッティングベクターのマーカー遺伝子カセットを挟む両側に挿入する。ここで用いるプロモータートラップ用ターゲッティングベクターとしては、例えばIRES (internal ribosome entry site)- β geo (β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) カセット (Mountford P. et al., Proc. Natl. Sci. USA, 91:4303-4307(1994)) を含有するpBSSK(-)-IRES- β geoや、IRES-Hygro (ハイグロマイシン耐性遺伝子) カセットを含有する同様のベクターなどを挙げることができる。ここでIRES-Hygroカセットは、前記IRES- β geoカセットの β geo部分をHygro (Invitrogen) に置き換えることなどにより作製することができる。

次に作製されたターゲッティングベクターを制限酵素で消化して直鎖化し、これをエレクトロポレーション等によりES細胞に導入する。

【0047】

導入に用いるES細胞としては、たとえばRF8細胞 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996))、JI細胞 (Li, E. et al., Cell, 69:915-926(1992))、CGR8細胞 (Nichols, J. et al., Development, 110:1341-1348(1990))、MG1.19細胞 (Gassmann, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:1292-1296(1995)) や、市販されているマウスES細胞 129SV (No. R-CMTI-1-15, R-CMTI-1A)、マウスES細胞 C57/BL6 (No. R-CMTI-2A)、マウスES細胞DBA-1 (No. R-CMTI-3A) (以上大日本製薬) 等のES細胞が挙げられる。

【0048】

ターゲッティングベクターのES細胞への導入は、エレクトロポレーション (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)等参照)、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine, Lipofectin; Invitrogen) を用いる方法などにより行われる。その後当該ターゲッティングベクターが導入されたES細胞を、用いたマーカー遺伝子(例えば薬剤耐性遺伝子)の特性に基づき選択する。選択されたES細胞において正しく相同組み換えが起こっていることはECAT遺伝子の一部をプローブとして用いたサザンプロット等により確認することができる。以上のようにしてECATゲノム遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するES細胞を作製することができる。

【0049】

ES細胞の培養には、当業者に知られた如何なる培地を用いても良い。例えばRF8細胞の場合、以下の組成：15%FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-g1

utamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME(GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)の培地等が挙げられる。また市販の調製済み培地（例えば大日本製薬No.R-ES-101等）を用いることもできる。

【0050】

ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した纖維芽細胞や纖維芽細胞由来のSTO細胞株 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)) を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えば PMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL（以上大日本製薬）などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は、マイトマイシンC処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス組み換えLIF、ラット組み換えLIF（ケミコン社等）などが用いられる。

【0051】

次に、前記ターゲッティングベクターを含有するES細胞をマウスに導入してノックアウトマウス（マーカー遺伝子ノックインマウス）を作製する。当該マーカー遺伝子ノックインマウスの作製方法は当業者に周知である。具体的には、前記ES細胞をマウス（例えばC57BL/6等）の胚盤胞 (blastocyst) にインジェクトし、偽妊娠させたメスのマウス (ICR等) の子宮内に移植することによりキメラマウスを作製する。その後キメラマウスと通常のマウス (C57BL/6等) とを交配させ、マーカー遺伝子がヘテロでノックインされたヘテロ変異マウスを作製する。ヘテロ変異マウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子がホモでノックインされたホモ変異マウスが得られる。

【0052】

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロ変異マウスから単離された体細胞であっても、またホモ変異マウスから単離された体細胞であっても良い。しかしながら、本発明のスクリーニングにおける体細胞からES様細胞への変換ステップ、およびES様細胞の維持を可能とするために、ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子をノックアウトした場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いる必要がある。当該ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子としては、具体的にはECAT4遺伝子 (Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)) が挙げられる。一方、ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子をノックアウトする場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いても、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いても良い。当該ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子としては、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT5遺伝子が挙げられる。すなわちECAT3遺伝子に関しては文献 (Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)) に示されるように、ECAT5遺伝子に関しては文献 (Takahashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003)) に示されるように、またECAT2遺伝子については後述の実施例において初めて明らかにされたように、これらのECATはES細胞の維持に影響を与えない因子である。このうちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子はES細胞の維持だけでなく増殖にも影響を与えないため、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いる場合は、ECAT2遺伝子またはECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異ノックインマウス由来の体細胞を利用することが好ましい。

【0053】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有することにより、ヘテロで含有した場合と比較して、マーカー遺伝子が2倍発現していることになるので、マーカー発現細胞の選択が正確かつ容易になるという利点がある。この観点からECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子は非常に有用なターゲットである。

【0054】

さらに、異なるECAT遺伝子のホモ変異マウス同士を交配させることにより、ダブルノックインマウスを作製することができる。例えばECAT2遺伝子のホモ変異マウスと、ECAT3遺伝子のホモ変異マウスを交配させることにより、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の両方がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウスを作製することができる。その際、

各ECAT遺伝子には、それぞれ異なるマーカー遺伝子がノックインされていることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向かうことができる。

【0055】

具体的には、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT4遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、に由来する体細胞が例示される。好ましくはECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がホモでマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス由来の体細胞が挙げられる。

【0056】

(1-1-b) ECAT遺伝子を破壊しない場合

ECAT遺伝子を破壊することなく、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる手法としては、当該ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターまたはPACベクター等を、マウスやラット等の個体に導入して作製したトランスジェニック非ヒト動物を利用する手法が挙げられる。以下BACベクターを例にとり説明する。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローンは、前記(1-1-a)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローンにおいて、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えばRed/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

【0057】

以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター（以下、マーカー遺伝子含有BACベクターと称することがある）を導入したトランスジェニック動物を作製する方法は周知であり、例えば実験医学別冊「新遺伝子工学ハンドブック改訂第3版」（羊土社, 1999年）等に基づき作製することができる。以下、マウスを例にとりトランスジェニック動物の作製につき説明する。

マウス受精卵への遺伝子の導入方法は特に限定されるものではなく、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等により導入することができる。導入後、得られた卵細胞を培養し、仮親マウスの輸卵管に移植し、その後被移植マウスを飼育し、産まれた仔マウスから所望の仔マウスを選択する。当該選択は、例えば仔マウス由来のDNAをドットプロットハイブリダイゼーション法やPCR法で導入遺伝子の可否を調べることにより行うことができる。

前記仔マウスと野生型マウスとを交配させ、ヘテロトランスジェニックマウス（導入遺伝子をヘテロで含有するマウス）を作製する。ヘテロマウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子含有BACベクターをホモで含有するトランスジェニックマウスを得ることができる。

【0058】

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロトランスジェニックマウスから

単離された体細胞であっても、またホモトランスジェニックマウスから単離された体細胞であっても良い。本トランスジェニックマウスにおいてはECAT遺伝子自身が発現しているため、前記ノックインマウスの場合と異なり、用いたECAT遺伝子がES細胞の維持に必須の遺伝子であるか否かを考慮する必要はない。よって、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても等しく用いることができ、マーカー遺伝子発現量が多いという観点から、マーカー遺伝子をホモで含有するトランスジェニックマウスを利用することが好ましい。

【0059】

さらに、異なるECAT遺伝子のトランスジェニックマウス同士を交配させることにより、ダブルトランスジェニックマウスを作製することができる。その際、交配させる各トランスジェニックマウスは、それぞれ異なるマーカー遺伝子を含有していることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向かうことができる。

【0060】

以上のノックインマウスまたはトランスジェニックマウスから単離する体細胞は、如何なる体細胞であっても良いが、その後のスクリーニングにおける取り扱いの容易さから、例えばリンパ球、皮膚細胞、纖維芽細胞などが挙げられる。これらの細胞は当業者に周知の手法にて単離することができる。

【0061】

以上のように、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした体細胞、またはマーカー遺伝子を導入した体細胞を、個体（マウス）レベルで維持することにより、あらゆる組織から、いつでも容易に体細胞を調製することが可能となるため、前記手法は非常に好ましい体細胞の供給方法である。

【0062】

（1-2）個体を利用せずに細胞レベルでマーカー遺伝子を存在させる方法

個体を利用せずに、細胞内において、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法はいろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカー遺伝子を存在させても良い。一般的には、マーカー遺伝子を含有するベクターを細胞に導入する方法が挙げられる。

【0063】

遺伝子導入に用いられる細胞は、体細胞であってもES細胞であっても良い。ここで用いる体細胞としては、マウス、ヒト、サル等の如何なる種に由来する体細胞であっても良い。当該体細胞は初代培養細胞であっても株化細胞であっても良く、具体的には、胎児纖維芽細胞（MEF）、骨髄由来間葉系幹細胞等の初代培養細胞や、NIH3T3のような株化細胞などが挙げられる。またES細胞としては、前記に挙げたマウスES細胞の他、ヒトやサルのES細胞も用いることができる。ここでヒトES細胞としては、KhES-1、KhES-2あるいはKhES-3（以上、京大再生研付属幹細胞医学研究センター）などが挙げられ、またサルES細胞としてはカニクイザルES細胞（旭テクノグラス）を挙げることができる。

【0064】

細胞へのベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド（Lipofectamine、Lipofectin；Invitrogen）を用いる方法などが挙げられる。

【0065】

導入に用いるベクターとしては、約300kbのDNAまでクローニング可能なベクターであるBACベクターやPACベクター、プラスミドベクター、さらには前記（1-1）に記載したターゲッティングベクターなどが挙げられる。以下これら各ベクターを用いてECAT遺伝子の発現

調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製する方法について記載する。

【0066】

(1-2-a) BACベクター、PACベクターを用いる場合

ECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACベクターやPACベクターを利用することにより、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させることができる。以下BACベクターを例にとり説明する。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローン（以下ECAT遺伝子含有BACクローンと称する）は、前記(1-1)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローンにおいて、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えば Red/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

【0067】

以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターを体細胞に導入することにより、本発明のスクリーニング用の体細胞とすることができる。ここで導入するBACベクターは1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。なお、当該BACベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、BACベクター中に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子（以下第2の薬剤耐性遺伝子と称する）が挿入されていることが好ましい。この場合、体細胞での発現を可能するために、当該第2の薬剤耐性遺伝子の5'側または3'側に体細胞で発現するプロモーターが付加されている必要がある。また当該第2の薬剤耐性遺伝子は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に存在するマーカー遺伝子と同じ種類の薬剤耐性遺伝子であっても良く、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であっても良いが、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であることが望ましい。前記で同じ種類の薬剤耐性遺伝子を用いた場合は、第2の薬剤耐性遺伝子の両側にloxP配列またはFRT配列を付加しておき、BACベクター導入細胞を選択培地中で選択した後に、リコンビナーゼCreまたはFLPにより第2の薬剤耐性遺伝子を切り出すことができる。

前記と異なり、BACベクター中に第2の薬剤耐性遺伝子を挿入しない場合は、当該第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発現ベクターを、前記BACベクターと共に共導入（co-transfection）し、選択培地で選択しても良い。その場合、第2の発現ベクターよりもBACベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。

【0068】

前記ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターをES細胞に導入した場合は、用いたマーカー遺伝子の性質に基づき、マーカー遺伝子が導入・発現しているES細胞を選択することができる。その後、当該ES細胞を体細胞に分化させることにより、本発明のスクリーニングに用いる体細胞とすることができる。ES細胞はフィーダー細胞の存在しない培養条件下で分化するため、このような条件下で分化させて得られた体細胞や、レチノイン酸等の当業者に知られた分化誘導剤で分化させて得られた体細胞を、本発明のスクリーニングに用いることができる。ここでES細胞から分化させた体細胞としては、例えば組織幹細胞、組織前駆細胞、または体細胞（神経細胞、皮膚角質細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、血液細胞、膵島細胞または色素細胞など）が挙げられる。

【0069】

(1-2-b) プロモーターを有さないプラスミドベクターを用いる場合

ECAT遺伝子の発現調節領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子を、プロモーターを有さないプラスミドベクターに挿入し、細胞を形質転換することにより、本発明のスクリーニン

グ用の細胞を作製することができる。

ここで用いるベクターとしては、例えば pBluescript(Stratagene)、pCR2.1(Invitrogen)といったプロモーターを有さないプラスミドベクターが挙げられる。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1kb、好ましくは約2kbが挙げられる。

【0070】

各ECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば(i)5'-RACE法（例えば、5' full Race Core Kit(宝酒造社製)等を用いて実施される）、オリゴキャップ法、S1プライマーマッピング等の通常の方法により5'末端を決定するステップ；(ii)Genome Walker Kit(クローンテック社製)等を用いて5'-上流領域を取得し、得られた上流領域について、プロモーター活性を測定するステップ；を含む手法等により同定することができる。このようにして同定したECAT遺伝子発現調節領域の3'側にマーカー遺伝子を融合し、これを前記プラスミドベクターに挿入することにより、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたプラスミドベクターを作製することができる。

以上のようにして作製したベクターを、前記(1-2-a)と同様にして体細胞やES細胞に導入することにより、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

【0071】

(1-2-c)ターゲッティングベクターを用いる場合

前記(1-1)に記載したターゲッティングベクターを体細胞若しくはES細胞に導入することによっても、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

前記ターゲッティングベクターを体細胞に導入する場合は、ベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、前記(1-2-a)と同様に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子（第2の薬剤耐性遺伝子）をターゲッティングベクター上に存在させるか、またはターゲッティングベクターと共に第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発現ベクターを共導入（co-transfection）し、選択培地で選択して得られた体細胞を本発明のスクリーニングに用いることがより好ましい。その場合、第2の発現ベクターよりも前記ターゲッティングベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。

【0072】

前記体細胞は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。前述のようにECAT4遺伝子を利用する場合は前記ノックイン遺伝子をヘテロで含有することが望ましく、またECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子およびECAT5遺伝子（特にECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子）を利用する場合は、前記ノックイン遺伝子をホモで含有することが望ましい。ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞は、ノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞に、さらにノックイン遺伝子（マーカー遺伝子を含有するターゲッティングベクター）を導入することにより作製することができる。またノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞を高濃度の薬剤を含む選択培地で培養することによっても、選択することができる。

さらに、前記ノックイン遺伝子をホモで含有する体細胞に対して別のノックイン遺伝子（別のECAT遺伝子がノックアウトされた遺伝子）を導入することにより、前記(1-1)と同様のダブルノックイン細胞を作製することができる。

【0073】

前記ターゲッティングベクターをES細胞に導入する場合は、ターゲッティングベクター上のマーカー遺伝子の性質に基づいて、マーカー遺伝子導入・発現細胞を選択することができる。当該ES細胞も、前記体細胞と同様、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。ホモ変異細胞の作製法としては、後述の実施例3に記載のECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の作製法を参照されたい。なお、ES細胞から体細胞への誘導方法は、前記(1-2-a)と同様である。

【0074】

本発明のスクリーニング工程(a)においては、以上のようにして作製した体細胞と、被験物質とを接觸させる。

ここで用いられる被験物質は、制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料（被験試料）を前記体細胞と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、アンチセンス核酸、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。具体的には、実施例に示したES細胞、またはES細胞の抽出液（抽出画分）、ES細胞由来のcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリー、増殖因子などが挙げられる。

これら被験試料は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験試料が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランや遺伝子導入用リピッドを用いて体細胞に導入する。

【0075】

体細胞と被験物質とを接触させる条件は、該細胞が死滅せず且つ被験物質が取り込まれるのに適した培養条件（温度、pH、培地組成など）であれば特に制限はない。

前記体細胞と被験物質との接触の前に、接触の際に、若しくは接触後に、ES細胞の培養条件で細胞培養を行う。ES細胞の培養は、当業者に知られた如何なる方法を用いても良い。例えばRF8細胞の場合、以下の組成：15%FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-glutamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME (GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)の培地等が挙げられる。また市販の調製済み培地（例えば大日本製薬No.R-ES-101等）を用いることもできる。

【0076】

ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した纖維芽細胞や纖維芽細胞由来のSTO細胞株 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996)) を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えば PMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL（以上大日本製薬）などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は、マイトマイシンC処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス組み換えLIF、ラット組み換えLIF（ケミコン社等）などが挙げられる。

前記ES細胞の培養条件における培養日数は、細胞の状態等により適宜変更できるが、1日～3日程度が好ましい。

【0077】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で選択を行う。当該薬剤は、体細胞と被験物質との接触の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに、ES細胞の培養条件で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

【0078】

前記工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する（工程(b)）。以下当該工程(b)について記述する。

【0079】

マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子の場合は、前記のように選択培地で培養することによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

マーカー遺伝子発現細胞が認められた場合、ここで用いた被験試料（被験物質）を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

前記スクリーニングは、必要に応じて何度も繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでcDNAライブラリーや細胞抽出物といった混合物を用いた場合、2回

目以降は、さらに当該混合物を細分化（分画）して同様のスクリーニングを繰り返し行うことにより、最終的に、体細胞核初期化因子の候補物質を選択することができる。

【0080】

以下、前記本発明のスクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法につき例示するが、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても以下を参考にして同様のスクリーニングを実施することができる。

【0081】

例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT2遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0082】

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス（ECAT2^{β geo/β geo}マウス）は、例えば後述の実施例3に記載の方法で作製することができる。このECAT2^{β geo/β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418(0.25mg/ml)で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0083】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【0084】

例2：ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0085】

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス（ECAT3^{β geo/β geo}マウス）は、例えば後述の実施例1に記載の方法で作製することができる。このECA

$T3\beta\text{geo}/\beta\text{geo}$ マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0086】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0087】

例3：ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中の生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

を含むスクリーニング方法が例示される。

【0088】

ECAT4遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたノックインマウス ($ECAT4\beta\text{geo}/+\text{マウス}$) の作製は、文献 (Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)) に記載の方法等で作製することができるが、簡単に述べると以下の方法が例示される。

【0089】

マウスECAT4遺伝子のエクソン2を、IRES- βgeo カセット (Mountford et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994)) で置き換えるためのターゲッティグベクターを以下のように作製する。ECAT4のイントロン1を含有する4kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG(配列番号：39)、AGGCAGGTCTTCAGAGGAAGGGCG(配列番号：40)) を用いてPCRで増幅することにより5'側アームを作製する。またエクソン3-イントロン3-エクソン4を含有する1.5kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (CGGGCTGTAGACCTGTCTGCATTCTG (配列番号：41)、GGTCCTTCTGTCTCATCCTCGAGAGT (配列番号：42)) 用いてPCRで増幅することにより3'側アームを作製する。これら5'側アームと3'側アームをIRES- βgeo カセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製する。このターゲッティングベクターをSacIIで切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞に導入する (Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996) 参照)。その後G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローンを選択する。この βgeo との相同組み換えES細胞をマウスのブластシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス ($ECAT4\beta\text{geo}/+\text{マウス}$) を樹立する。

【0090】

次にこの $ECAT4\beta\text{geo}/+\text{マウス}$ からリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対

してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0091】

例4：ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0092】

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス (ECAT5^{β geo/β geo}マウス) は、例えば後述の実施例2に記載の方法 (特開2003-265166号公報) で作製することができる。このECAT5^{β geo/β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0093】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0094】

例5：2つのECAT遺伝子を利用したスクリーニング

前述のように、2つの異なるECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異マウス同士を交配させることによりダブルノックインマウスを作製することができ、当該マウス由来の体細胞をスクリーニングに用いることができる。具体的には、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせに係るダブルノックインマウス由来の体細胞を用いたスクリーニング方法が例示される。すなわちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0095】

ここでノックインされる薬剤耐性遺伝子は、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子とで異なっていることが望ましい。この場合、2つの異なる薬剤耐性遺伝子 (例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子) により二重に選択することが可能となるため、本発

明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上される。

【0096】

ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子のダブルノックインマウス (ECAT2^{Hygro/Hygro} ECAT3^{β geo/β geo}マウス) は、後述の実施例1および3 (ただし薬剤耐性遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子) で作製したECAT2^{Hygro/Hygro}マウスとECAT3^{β geo/β geo}マウスとを交配されることにより得ることができます。このECAT2^{Hygro/Hygro} ECAT3^{β geo/β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418(0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。この選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0097】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0098】

本発明のスクリーニングで選択された体細胞核初期化(候補)物質が体細胞の核を初期化するか否かは、(1)当該核初期化(候補)因子により体細胞から変換されたES様細胞がOct3/4やEcat4(Nanog)といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2)前記ES細胞が in vitroにおいてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3)前記ES細胞をマウスプラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

【0099】

(2)本発明の核初期化物質

本発明は、前記本発明のスクリーニング方法を用いて選択される体細胞核初期化物質を提供する。当該核初期化物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物のいずれかである。後述の実施例で用いたES細胞も体細胞核初期化物質の1つである。好ましくは、ES細胞由来の遺伝子またはタンパク質が例示される。本発明の核初期化物質は、幹細胞療法において有用である。すなわち、患者から体細胞(組織幹細胞、分化細胞)を採取し、これに本発明の核初期化物質を添加することにより、ES様細胞が出現する。このES様細胞をレチノイン酸、増殖因子(例えはEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等)、またはグルココルチコイドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

【0100】

(3)本発明のノックインマウスの新規用途(本発明スクリーニング用体細胞の供給源としての使用)

従来、ある遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたノックインマウスは、その遺伝子の機能解析のために利用されてきた。また場合によっては疾患モデル動物となり得るケースもあった。しかしながら本発明で開示された新たなスクリーニング方法で用いる体細胞の供給源としての利用はなされていない。

本発明は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、本発明のスクリーニングにおいて用いる体細胞の供給源としての用途を提供するものである。

【0101】

当該ノックインマウスの作製法等については、前記(1)本発明のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。当該ノックインマウスは、ECAT2遺

伝子、ECAT3遺伝子及び/又はECAT5遺伝子を用いる場合は、当該遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を、ホモで含有することが好ましい。一方、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を用いる場合はヘテロで含有することが好ましい。マーカー遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。中でも薬剤耐性遺伝子を含有する遺伝子が好ましい。

【0102】

(4)本発明の体細胞

本発明は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞を提供する。

当該体細胞の作製法等については、前記(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。本発明の体細胞は、前記本発明のスクリーニング方法、または後述の本発明のES様細胞の選択方法において、有効に使用される。

【0103】

(5)本発明のES様細胞の選択方法

本発明はまた、以下の(a)および(b)の工程：

- (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法を提供する。

【0104】

前記本発明のスクリーニング方法において述べたようなECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞は、ES様細胞の選択のためにも有効に用いられる。例えば幹細胞療法を念頭においていた場合、ヒトの体細胞を核初期化物質で刺激することにより出現したES様細胞を、他の細胞(体細胞)から分離(純化)し、後の治療に用いることが望ましい。前述のように、本発明のシステムは、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を容易に選択できるシステムであるため、ES様細胞を選択・分離する際に有効に用いることができる。

本発明のES様細胞の選択方法は、前記ヒトの治療のみならず、イン・ビトロおよびイン・ビボでのES細胞関連の様々な研究において、ES細胞を選択(分離)する如何なる目的においても使用することができる。

【0105】

前記において、1)ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞の作製方法、2)当該体細胞と体細胞核初期化物質との接触方法、および3)マーカー遺伝子発現細胞の選択方法については、全て「(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記述したものと同様である。なお、マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は選択培地で培養することにより、マーカー遺伝子発現細胞を容易に選択(分離)することができる。またマーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、または発色酵素遺伝子を用いた場合は、セルソーター、限界希釈法または軟寒天コロニー法などを利用することにより、当該細胞を選択(分離)することができる。

前記で「核初期化物質」とは前記本発明のスクリーニングで得られるような、体細胞の核初期化に関与する物質を指す。なお、後述の実施例においては、体細胞の核初期化物質としてES細胞自身を用いることにより、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択している。

【0106】

本発明のES様細胞選択方法においては、如何なるECAT遺伝子(ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子)も使用することができる。具体例として、以下に示

した選択方法が例示される。

すなわちECAT2遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0107】

またECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0108】

またECAT5遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0109】

またECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0110】

またECAT4遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0111】

以上のようなES様細胞の選択方法において用いる体細胞は、ヒトの治療を念頭においていた場合は、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有するヒト体細胞であることが望ましい。具体的には以下のようにして作製された体細胞が用いられる。

【0112】

すなわちまず、患者の体細胞をヒトから単離することなどにより調製する。体細胞としては、疾患に関与する体細胞、疾患治療に関与する体細胞などが挙げられる。このヒト体細胞に対し、前記(1-2)の項に記載のいずれかのベクターを導入する。具体的にはBACベクター(ECAT遺伝子の発現調節領域の下流にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター)またはPACベクターを導入することが望ましい。ここで導入するBACベクター(PACベクター)は1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。このBACベクター導入細胞に対して核初期化物質を添加することにより、ES様細胞を出現させる。このES様細胞を、用いたマーカー遺伝子の性質に応じて選択する。例えばマーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を用いた場合は、核初期化物質添加後に選択培地で選択することにより、薬剤耐性を指標として、ES様細胞を容易に選択することができる。

【0113】

(6) 本発明のES様細胞

本発明は、本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニングにより出現したマーカー遺伝

子発現細胞（ES様細胞）、および本発明のES様細胞の選択方法により選択されたES様細胞を提供する。当該ES様細胞は、その後のインビトロおよびインビボでの評価において有効に用いることができる。すなわち当該ES様細胞の分化誘導能や、分化誘導した細胞の個体（マウス等）への移植定着などを調べることは、ヒトにおける幹細胞療法の予備検討やES細胞に関する種々の研究において極めて重要である。本発明のES様細胞は、そのような研究や検討において有効に用いられる。

さらに本発明のES様細胞の選択法により出現したヒトのマーカー遺伝子発現細胞（ES様細胞）を、レチノイン酸、増殖因子（例えばEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等）、またはグルココルチコイドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

【0114】

(6) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供する。

【0115】

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたES細胞を、ES細胞としての状態（未分化・多能性）を維持できない培地中で培養した場合、マーカー遺伝子の発現は消失する。一方、前記培地中にES細胞の未分化・多能性維持物質が存在していれば、マーカー遺伝子の発現は存続する。この性質を利用することにより、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質を容易にスクリーニングすることができる。

【0116】

前記スクリーニング工程(a)において用いられるES細胞としては、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞であればどのようなものであっても良い。具体的には、例えば、前記(1-1-a)に記載されたノックインマウス由来のES細胞、前記(1-1-b)に記載されたトランスジェニックマウス由来のES細胞、前記(1-2-a)に記載されたBACベクター若しくはPACベクターを含有するES細胞、前記(1-2-b)に記載されたプラスミドベクターを含有するES細胞、若しくは前記(1-2-c)に記載されたターゲッティングベクターを含有するES細胞を挙げることができる。

【0117】

前記スクリーニング工程(a)において用いられる「ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地」とは、ES細胞としての状態を維持できない培地、未分化状態を維持できない培地であれば、どのような培地であっても良い。例えばマウスES細胞は、低密度では、その維持（未分化・多能性維持）に血清またはフィーダー細胞が必須であることが知られているため、当該ES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件が挙げられる。またヒトES細胞の維持（未分化・多能性維持）にはフィーダー細胞が必須であるため、ヒトES細胞の培養条件からフィーダー細胞を除去した条件が挙げられる。さらにヒトES細胞の場合はフィーダー細胞存在下でも分化する細胞が出現するため、フィーダー細胞存在下の培養条件でも良い。

具体的には、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p 14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件などが例示される。

【0118】

前記工程(a)は、前記ES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させることにより行われる。被験物質は、ES細胞を未分化・多能性非維持培地に移す前に、また移す際に、若しくは移した後に、当該ES細胞と接触させる。

本スクリーニングで用いられる被験物質は、制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料（被験試料）を前記ES細胞と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、細胞分泌産物、血清、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、アンチセンス核酸、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。具体的には、動物血清またはその画分、フィーダー細胞の分泌産物またはその画分などが挙げられる。

これら被験試料は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験試料が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランや遺伝子導入用リピッドを用いて体細胞に導入する。

【0119】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で選択を行う。当該薬剤は、ES細胞と被験物質との接触の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに被験物質存在下、ES細胞の未分化・多能性非維持培地中で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

【0120】

前記工程(a)の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する（工程(b)）。当該工程(b)については、前記「(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記載した通りである。マーカー遺伝子発現細胞が認められた場合、ここで用いた被験試料（被験物質）を、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

前記スクリーニングは、必要に応じて何度も繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでフィーダー細胞分泌産物や血清といった混合物を用いた場合、2回目以降は、さらに当該混合物を細分化（分画）して同様のスクリーニングを繰り返し行うことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質を選択することができる。

なお、前記のように被験試料として混合物を用いてスクリーニングを行った場合、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共にES細胞の増殖促進物質も選択される可能性がある。すなわち、ある混合物（画分A）を前記本発明のスクリーニング方法に供し、生存細胞が確認され且つ当該生存細胞の細胞数が増加した場合には、当該画分中には、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共に、ES細胞の増殖促進物質も含まれていると考えられる（もちろん1つの物質が両方の性質を兼ね備えている場合もある）。その場合、当該画分Aをさらに分画し、片方の画分（画分B）を本発明のスクリーニングに供した場合には生存細胞が確認されるが細胞数の増加は認めらず、もう片方の画分（画分C）を本発明のスクリーニングに供した場合は生存細胞が認められなかった場合、画分BにはES細胞の未分化・多能性維持物質が含まれ、画分CにはES細胞の増殖促進物質が含まれることが考えられる。本発明のスクリーニングは、そのようなES細胞の増殖促進（候補）物質の選択にも有用である。

【0121】

以下、前記スクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用したスクリーニング方法につき例示するが、他のECAT遺伝子についても以下を参考にして同様に実施することができる。

【0122】

例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT2遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

- (a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

を含むスクリーニング方法が例示される。

【0123】

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば実施例3に記載の方法で作製することができる（ECAT2遺伝子ホモ変異RF8 ES細胞）。このES細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418（0.25mg/ml）およびハイグロマイシン（0.1mg/ml）で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0124】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進（候補）物質を選択することもできる。

【0125】

例2：ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

- (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

を含むスクリーニング方法が例示される。

【0126】

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば、実施例1で作製した β geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター（ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター）を導入することにより、ECAT3遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418（0.25mg/ml）およびハイグロマイシン（0.1mg/ml）で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0127】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進（候補）物質を選択することもできる。

【0128】

例3：ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
 を含むスクリーニング方法が例示される。

【0129】

ECAT遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞は、前記ECAT2やECAT3と同様にターゲッティングベクター（例えばECAT4遺伝子を β geo遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター）をES細胞に導入・相同組み換えを起こすことにより作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0130】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進(候補)物質を選択することもできる。

【0131】

例4：ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
 を含むスクリーニング方法が例示される。

【0132】

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞の作製法およびそれを用いたスクリーニング法は、前記ECAT2やECAT3の場合と同様である。

【0133】

前記本発明のスクリーニングにより選択されたES細胞の未分化・多能性維持(候補)物質がES細胞の未分化・多能性を維持するか否かは、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中に当該候補物質を添加した培養条件下でES細胞を培養し、ES細胞としての種々の能力を調べることにより、確認することができる。具体的には、例えば前記培養条件下で培養したES細胞が、(1) Oct3/4やEcat4(Nanog)といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2) 前記ES細胞が in vitroにおいてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3) 前記ES細胞をマウスプラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

【0134】

(7) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質

本発明は前記スクリーニング方法を用いて選択されるES細胞未分化・多能性維持物質を提供する。当該ES細胞の未分化・多能性維持物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機

化合物、無機化合物のいずれかであり、好ましくは、フィーダー細胞分泌産物または血清由来成分が例示される。本発明のES細胞未分化・多能性維持物質は、ES細胞の臨床応用において有用である。すなわち臨床応用においては、ヒトES細胞またはそれから分化させた分化細胞を無血清下、フィーダー細胞非存在下で培養することが必須となるため、本発明のES細胞未分化・多能性維持物質の無血清培地への添加により、前記ES細胞の臨床応用が可能となる。

【0135】

(8) 本発明のノックインマウスの新規用途（本発明スクリーニング用ES細胞の供給源としての使用）

本発明は、本発明のノックインマウスの、ES細胞未分化・多能性維持物質スクリーニング用のES細胞の供給源としての用途を提供する。本発明のノックインマウスについては前記(3)に記載した通りである。ノックインマウスからのES細胞の単離は、当業者に周知の手法により行うことができる。

【0136】

(9) 本発明のES細胞

本発明は、ECAAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を提供する。当該ES細胞の作製法等については、前記(1)および(6)において詳しく述べたとおりである。本発明のES細胞は、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法において有効に使用される。

【0137】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【実施例1】

【0138】

ECAT3遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT3遺伝子のコーディング領域を β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子（ β geo）に置き換え、ECAT3遺伝子をノックアウトするとともに、ECAT3遺伝子の発現をX-Gal染色や薬剤耐性でモニターできるようにしたホモ変異ノックインマウス（以下、ECAT3 $^{\beta\text{ geo}}/\beta\text{ geo}$ マウス）を作製した。このECAT3 $^{\beta\text{ geo}}/\beta\text{ geo}$ マウスの作製は文献（Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)）の記載に基づき行った。簡単に述べると以下のようになる。

【0139】

まず、マウスECAT3遺伝子を含有するBACクローンを、ECAT3 cDNAの一部をプライマーに用いたPCRスクリーニングにより、BACライブラリー（Research Genetics）のDNAプールから同定し、塩基配列を決定した。

マウスECAT3遺伝子のエクソン3～エクソン7を、IRES- β geoカセット（Mountford et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994)）で置き換えるためのターゲッティングベクターを以下のように作製した。ECAT3のイントロン1～エクソン3を含有する1.4kbフラグメントを、前記マウスBAC DNAを鑄型とし、プライマー（ACCAAGGTACCCATCCAA（配列番号：43）、CTTCACCAAGATTCCGATG（配列番号：44））を用いてPCRにより増幅することにより5'側アームを作製した。またエクソン7～エクソン8を含有する3.5kbフラグメントを、マウスBAC DNAを鑄型とし、プライマー（GAATGGTGGACTAGCTTTG（配列番号：45）、TGCCATGAA TGTGATATGCAG（配列番号：46））を用いてPCRにより増幅することにより3'側アームを作製した。これら5'側アームと3'側アームを β geoカセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製した。このターゲッティングベクターをNotIで切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞（Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)）に導入した。G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローンを選択した。この β geoとの相同組み換えES細胞をマウス(C57BL/6)のプラスチックシートにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス(ECAT3 $^{\beta\text{ geo}}/+$ マウス)を樹立し、さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウス(ECAT3 $^{\beta\text{ geo}}/\beta\text{ geo}$ マウ

ス)がメンデルの法則に従って誕生した。

【0140】

次に、ECAT3 β geo/ β geoマウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取した。この細胞を文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件で2日間培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択した。その結果、これらリンパ球はすべて死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。またこのG418濃度では正常ES細胞はすべて死滅することも確認された。

【0141】

次に、ECAT3 β geo/ β geoマウス由来のリンパ球とRF8細胞とを、多田らの方法 (Tada, M., et al., Curr. Biol., 11(19): p1553-1558(2001)) に従って電気的に融合し、前記ES細胞の培養条件でフィーダー細胞 (STO細胞) 上で2日間培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択したところ、多数のES細胞様コロニーが得られた。これらのコロニーを単離、培養し、RNAを回収した。ノザンプロットによりこれらの細胞は全クローニングにおいてOct3/4やECAT4 (Nanog) を発現しており、またこのクローニングをマウスプラストシストに移植したところキメラマウスが形成されたことから、G418で選択された細胞は確かにES細胞としての性質を有するES様細胞であることが明らかとなった (図1)。これらの細胞をフローサイトメトリー (FACS) で解析したところ、大きさ (Forward scatter) は約2倍となり、DNA量も4倍体となっていた (図2)。以上のことから、これらのコロニーはECAT3 β geo/ β geoマウス由来のリンパ球と正常ES細胞との融合により、リンパ球核の初期化 (ES細胞化) が起きたためにG418耐性になったことが分かった。このようにECAT3 β geo/ β geoマウス由来の体細胞は、ES様細胞に変換された時のみ薬剤耐性となる。従ってこの性質を利用すれば、ES様細胞の選択や、ES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を容易にスクリーニングできることが明らかとなった。

【実施例2】

【0142】

ECAT5遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT5遺伝子のコーディング領域を β geoに置き換えたホモ変異ノックインマウス (ECAT5 β geo/ β geoマウス) を文献 (Takahashi, K., K. Mitsui, and S. Yamanaka, Nature, 423(6939): p541-545(2003)、特開2003-265166号公報) 記載の方法に基づき作製した。このECAT5 β geo/ β geoマウス由来のリンパ球を用いて、上記と同様のプロトコールで実験を行った。ECAT5 β geo/ β geoマウス 2×10^6 個のリンパ球を 4×10^5 個のES細胞と融合し、G418で選択培養したところ、実施例1で行ったECAT3の場合よりは数が少ないものの、同様のES細胞様コロニーが得られた。よってECAT5も同様にES様細胞の選択システムに利用できることが分かった。

【0143】

なおECAT3の場合よりもコロニー数が少なかった理由としては、ES細胞に極めて特異的に発現するという観点からは両者は同じであるものの、ECAT3はES細胞の維持や増殖にとつては必須ではないのに対し、ECAT5はES細胞の増殖を促進する因子であるため、その遺伝子量の減少 (ノックアウト) はES細胞化にとって不利になっていることが考えられた。

【実施例3】

【0144】

ECAT2遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT2遺伝子がES細胞で特異的に発現することは、既にノザンプロット解析により明らかになっている (WO 02/097090 号公報参照)。さらに詳細な発現解析をRT-PCRにより行ったところ、未分化ES細胞での特異的な発現が確認された (図3)。またサイクル数を増やすことにより精巣、および卵巣でも発現するが体組織では全く発現が認められなかった (図3)。

【0145】

マウスECAT2ゲノム配列を、公的データベースであるMouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) により同定した。このECAT2ゲノムを含有す

るBACクローンをPCRとサザンハイブリダイゼーションによりクローニングした。

ECAT2遺伝子をノックアウトするためにエクソン1~3を β geo（ β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）またはHygro（ハイグロマイシン耐性遺伝子）と置換するためのターゲッティングベクターを作製した。すなわち、マウスECAT2遺伝子のエクソン1~3をIRES (internal ribosome entry site)- β geoカセット若しくはIRES-Hygroカセットで置換するようにデザインしたターゲッティングベクターを作製した。

【0146】

具体的にはまず、マウスECAT2ゲノムの5' flanking領域～エクソン1の領域を含有するフラグメントと、エクソン3～3' flanking領域を含有するフラグメントを、それぞれ前記BACクローンを鑄型としたPCRにより増幅し、これらをそれぞれターゲッティングベクターの5'-アームおよび3'-アームとした。5'-アームはプライマー(CCGCGGAAAGTCAAGAGATTGGGT GG (配列番号：47)、GCGGCCGCCTTACGGTCACGAGGGTCAC (配列番号：48))により増幅し、3'-アームはプライマー(TGTGGCCAGTGTGTTGGTCTGGCGGG (配列番号：49)、CTCGAGGACTCGC CATTCTAGCCAAG (配列番号：50))により増幅した。得られた2つの増幅断片をpBSSK(-)-IRES- β geoまたはpBSSK(-)-IRES-HygroのIRES- β geoカセット若しくはIRES-Hygroカセットにライゲーションすることによりターゲッティングベクターを完成し、これをSacIIで切断して直鎖化した。

前記ターゲッティングベクターによるECAT2遺伝子破壊の概略を図4に示す。

【0147】

直鎖化したターゲッティングベクターをエレクトロポレーションによりRF8ES細胞 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996)) に導入し、各薬剤 (β geoの場合はネオマイシン (G418)、Hygroの場合はハイグロマイシン) により選択した。相同組み換えが正しく起こっていることの確認はサザンプロットにて行った。すなわち、前記ES細胞から抽出したゲノムDNAをPstIで切断後、電気泳動し、ナイロンメンブランへ転写した。これをECAT2遺伝子の3'領域のプローブとハイブリダイゼーションさせた。正常ゲノムからは18kbpのバンド、 β geoベクターとの相同組み換えでは13kbpのバンド、そしてHygroベクターとの相同組み換えでは9kbpのバンドが検出される。結果を図5に示す。各薬剤耐性ES細胞において相同組み換えが正しく起こっていることが確認された。

さらにHygroベクターとの相同組み換えES細胞に β geoベクターを導入し、ネオマイシンで選択したところ、両者で相同組み換えが起こった、すなわちECAT2遺伝子がホモ変異となったES細胞を3クローン得ることが出来た。 β geoベクターとHygroベクターの両者で正しく相同組み換えが起こっていることは前記と同様のサザンプロットにより確認した(図5)。またノザンプロットにより、これらのクローンはECAT2の発現が消失していることが確認できた(図6)。

【0148】

このホモ変異ES細胞がES細胞としての機能を保持しているかどうかを調べたところ、形態、増殖、分化能すべてが正常であった。以上の結果から、ECAT2はES細胞、精巣、卵巣に特異的に発現するが、ESの維持や初期発生には必須でない因子であることが分かった。従って、ECAT3遺伝子と同様にES細胞の選択に極めて有効に利用できることが明らかとなった。

次に、 β geoとの相同組み換えES細胞をマウス (C57BL/6) のブラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウスを樹立した。さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウスがメンデルの法則に従って誕生した。このホモ変異マウス由来の体細胞を用いて、実施例1と同様のプロトコールで実験を行うことにより、実施例1と同様にES細胞様コロニーを得ることができる。

すなわち、ECAT2 β geo/ β geoマウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取し、実施例1と同様のプロトコールでこのリンパ球とES細胞 (RF8細胞) とを融合し、G418で選択培養したところ、実施例1と同様に多数のES細胞様コロニーが得られた。従ってECAT2もECAT3と同様に核初期化因子のスクリーニング等に利用できることが分かった。

【実施例4】

【0149】

ECAT3^{β geo/β geo}マウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT3^{β geo/β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【実施例5】

【0150】

ECAT2^{β geo/β geo}マウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2^{β geo/β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【実施例6】

【0151】

ECAT2^{Hygro/Hygro}・ECAT3^{β geo/β geo}ダブルノックインマウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2^{Hygro/Hygro}・ECAT3^{β geo/β geo}ダブルノックインマウスはECAT2^{Hygro/Hygro}マウスとECAT3^{β geo/β geo}マウスを交配させることにより得ることができる。このダブルノックインマウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞（細胞名）上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にて薬剤選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【実施例7】

【0152】

ECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例3で作製したECAT2遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を、被験物質存在下、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996))

)) に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

【実施例8】

【0153】

ECAT3遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例1で作製した β geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター (ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター) を導入し、ECAT3遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を作製する。この細胞を、被験物質存在下、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

【産業上の利用可能性】

【0154】

本発明により、体細胞核初期化物質の効率的なスクリーニング方法が提供される。核初期化物質は、幹細胞療法を現実化するために極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのような核初期化物質の早期発見が可能となる。さらに本発明により、ES細胞未分化・多能性維持物質の効率的なスクリーニング方法が提供される。ES細胞未分化・多能性維持物質はES細胞の臨床応用において極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのようなES細胞未分化・多能性維持物質の早期発見が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1】実施例1の概要を示した図である。ECAT3 β geo/ β geoマウスより単離したリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した結果、Oct3/4およびNanog(ECAT4)陽性のES様細胞が出現したことを示している。

【図2】ECAT3 β geo/ β geoマウスより単離したリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した細胞をフローサイトメトリー (FACS) で解析した結果を示す図である。融合前 (図中WT) と比べ、融合細胞 (図中Fusion) では、大きさ (FSC) は約2倍となり、DNA量 (PI) も4倍体となったことを示している。

【図3】ECAT2遺伝子の各種細胞・組織における発現をRT-PCRで解析した結果を示す図である。(A) はRT-PCRによる増幅サイクルを25回繰り返し結果を示し、また(B) は30回繰り返した結果を示す。ESG1はECAT2の結果を、NAT1はポジティブコントロールであるNAT1の結果を指す。各レーンは以下の細胞・組織におけるECAT2またはNAT1の発現を示す：レーン1：未分化MG1.19細胞、レーン2：分化MG1.19細胞、レーン3：RT-MG1.19細胞、レーン4：未分化RF-8細胞、レーン5：分化RF-8細胞、レーン6：RT-RF-8細胞、レーン7：脳、レーン8：心臓、レーン9：腎臓、レーン10：精

巢、レーン11：脾臓、レーン12：筋肉、レーン13：肺、レーン14：胃、レーン15：卵巣、レーン16：胸腺、レーン17：肝臓、レーン18：皮膚、レーン19：小腸。

【図4】ECAT2遺伝子を β geo（ β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）またはHygro（ハイグロマイシン耐性遺伝子）でノックインするためのターゲッティングベクターと、それを用いたECAT2遺伝子破壊の概念を示した図である。

【図5】ターゲッティングベクターをES細胞に導入して得られた薬剤耐性細胞において、相同組み換えが正しく起こっていることを確認したサザンプロット解析の図である。図中、WTはベクター導入のないES細胞の結果を示す。また図中、-/-（レーンNo. 27、35、36）は β geoベクターとHygroベクターの両者で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の結果を、 β -geo +/-（レーンNo. 78、30、32、33）は β geoベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、またhygro +/-（レーン4、7、31、34）はHygroベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、それぞれ示す。

【図6】 β geoベクターとHygroベクターの両者で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞において、ECAT2遺伝子の発現が消失していることを確認したノザンプロット解析の図である。図中、各レーンの説明は図5と同じである。上図はノザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラムであり、下図はリボゾーマルRNAをエチジウムプロマイド染色した写真を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0156】

配列番号：39に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：40に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：41に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：42に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：43に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：44に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：45に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：46に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：47に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：48に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：49に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：50に記載の塩基配列はプライマーである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanaka, Shinya
Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Screening method for substances which induce
nuclear reprogramming of somatic cells

<130> 133279

<150> JP 2004-042337

<151> 2004-02-19

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1623

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (50)..(1369)

<400> 1

tgactgatct tgagttgca taggcttcct gcggtaaaac gggtacact atg gcc tct 58
Met Ala Ser
1

ctg aag agg ttt cag acg ctc gtg ccc ctg gat cac aaa caa ggt acc 106
Leu Lys Arg Phe Gln Thr Leu Val Pro Leu Asp His Lys Gln Gly Thr
5 10 15

tta ttt gaa att att gga gag ccc aag ttg ccc aag tgg ttc cat gtc 154
Leu Phe Glu Ile Ile Gly Glu Pro Lys Leu Pro Lys Trp Phe His Val
20 25 30 35

gaa tgc ctg gaa gat cca aaa aga ctg tac gtg gaa cct cgg cta ctg 202
Glu Cys Leu Glu Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Val Glu Pro Arg Leu Leu
40 45 50

gaa atc atg ttt ggt aag gat gga gag cac atc cca cat ctt gaa tct 250
Glu Ile Met Phe Gly Lys Asp Gly Glu His Ile Pro His Leu Glu Ser
55 60 65

atg ttg cac acc ctg ata cat gtg aac gtg tgg ggc cct gaa agg cga 298
Met Leu His Thr Leu Ile His Val Asn Val Trp Gly Pro Glu Arg Arg

70	75	80	
gct gag att tgg ata ttc gga ccg ccg cct ttc cga agg gac gtt gac Ala Glu Ile Trp Ile Phe Gly Pro Pro Pro Phe Arg Arg Asp Val Asp 85	90	95	346
cgg atg ctc act gat ctg gct cac tat tgc cgc atg aaa ctg atg gaa Arg Met Leu Thr Asp Leu Ala His Tyr Cys Arg Met Lys Leu Met Glu 100	105	110	115
ata gag gct ctg gag gct gga gtt gag cgt cgt atg gcg gcc cat Ile Glu Ala Leu Glu Ala Gly Val Glu Arg Arg Arg Met Ala Ala His 120	125	130	442
aag gct gcc acc cag cct gct ccc gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro 135	140	145	490
cgg ccc gct tcc gtg aag gtc cct gag acg gcc acc cag cct gct ccc Arg Pro Ala Ser Val Lys Val Pro Glu Thr Ala Thr Gln Pro Ala Pro 150	155	160	538
gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct cag ccc gct ccg gtg cag gag gtc Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Pro Ala Pro Val Gln Glu Val 165	170	175	586
cgc gag gct gcc cct cag cag gct tcc gtg cag gag gag gtc cgc gag Arg Glu Ala Ala Pro Gln Gln Ala Ser Val Gln Glu Glu Val Arg Glu 180	185	190	195
gct gcc acc gag cag gct ccc gtg cag gag gtc cgc gag gct gcc acc Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Arg Glu Ala Ala Thr 200	205	210	682
gag cag gct ccc gtg cag gag gtc agc gag gct gcc acc gag cag gct Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Ser Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala 215	220	225	730
ccc gtg cag gag gtc aac gag gct gcc acc gag cag gct tcc gtg cag Pro Val Gln Glu Val Asn Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala Ser Val Gln 230	235	240	778
gcg gtc cgc gag gct gcc acc cgg ccg gct ccc ggg aag gtc cgc aag Ala Val Arg Glu Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Gly Lys Val Arg Lys 245	250	255	826
gcg gcc acc cag ccg gct ccg gtg cag gtt tgc cag gag gcc acc cag Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Gln Val Cys Gln Glu Ala Thr Gln 260	265	270	275

ttg gct ccc gtg aag gtc cgc gag gcg gcc acc cag ccg gct tcc ggg	922
Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Pro Ala Ser Gly	
280 285 290	
aag gtc cgc gag gcg gcc acc cag ttg gct cct gtg aag gtc cgc aag	970
Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Lys	
295 300 305	
gca gcc acc cag ttg gct cct gtg aag gtc cac gag gcg gcc acc cag	1018
Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val His Glu Ala Ala Thr Gln	
310 315 320	
ccg gct ccg ggg aag gtc agc gat gct gcc acg cag tcg gct tcg gtg	1066
Pro Ala Pro Gly Lys Val Ser Asp Ala Ala Thr Gln Ser Ala Ser Val	
325 330 335	
cag gtt cgt gag gct gcc acg cag ctg tct ccc gtg gag gcc act gat	1114
Gln Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ser Pro Val Glu Ala Thr Asp	
340 345 350 355	
act agc cag ttg gct cag gtg aag gct gat gaa gcc ttt gcc cag cac	1162
Thr Ser Gln Leu Ala Gln Val Lys Ala Asp Glu Ala Phe Ala Gln His	
360 365 370	
act tca ggg gag gcc cac cag gtt gcc aat ggg cag tct ccc att gaa	1210
Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser Pro Ile Glu	
375 380 385	
gtc tgt gag act gcc acc ggg cag cat tct cta gat gtc tct agg gcc	1258
Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val Ser Arg Ala	
390 395 400	
ttg tcc cag aag tgt cct gag gtt ttt gag tgg gag acc cag agt tgt	1306
Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr Gln Ser Cys	
405 410 415	
ttg gat ggc agc tat gtc ata gtt cag cct cca agg gat gcc tgg gaa	1354
Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp Ala Trp Glu	
420 425 430 435	
tca ttt atc ata tta taaatgcatac tctgggtgtga gccaggatag atggcacacg	1409
Ser Phe Ile Ile Leu	
440	
tctgcaaatac cagaacctaa aggcaggggt tagcttgggc tgagtaaggc aatgatctta	1469
aacctcagcc tgcctaagac tcccttcatac tttcttctg gttttgcc taggaatcgg	1529
gaagaacaga gtagagctgt tttgtttcc ccattgtgtt aaatgttgc agacacaatt	1589

taaagtattc taataaaaaa aaaattgcat tccc 1623

<210> 2

<211> 440

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Ser Leu Lys Arg Phe Gln Thr Leu Val Pro Leu Asp His Lys
1 5 10 15

Gln Gly Thr Leu Phe Glu Ile Ile Gly Glu Pro Lys Leu Pro Lys Trp
20 25 30

Phe His Val Glu Cys Leu Glu Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Val Glu Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Glu Ile Met Phe Gly Lys Asp Gly Glu His Ile Pro His
50 55 60

Leu Glu Ser Met Leu His Thr Leu Ile His Val Asn Val Trp Gly Pro
65 70 75 80

Glu Arg Arg Ala Glu Ile Trp Ile Phe Gly Pro Pro Pro Phe Arg Arg
85 90 95

Asp Val Asp Arg Met Leu Thr Asp Leu Ala His Tyr Cys Arg Met Lys
100 105 110

Leu Met Glu Ile Glu Ala Leu Glu Ala Gly Val Glu Arg Arg Arg Met
115 120 125

Ala Ala His Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu
130 135 140

Ala Ala Pro Arg Pro Ala Ser Val Lys Val Pro Glu Thr Ala Thr Gln
145 150 155 160

Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Pro Ala Pro Val
165 170 175

Gln Glu Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Gln Ala Ser Val Gln Glu Glu
180 185 190

Val Arg Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Arg Glu
195 200 205

Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Ser Glu Ala Ala Thr
210 215 220

Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Asn Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Ala Val Arg Glu Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Gly Lys
 245 250 255
 Val Arg Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Gln Val Cys Gln Glu
 260 265 270
 Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Pro
 275 280 285
 Ala Ser Gly Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys
 290 295 300
 Val Arg Lys Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val His Glu Ala
 305 310 315 320
 Ala Thr Gln Pro Ala Pro Gly Lys Val Ser Asp Ala Ala Thr Gln Ser
 325 330 335
 Ala Ser Val Gln Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ser Pro Val Glu
 340 345 350
 Ala Thr Asp Thr Ser Gln Leu Ala Gln Val Lys Ala Asp Glu Ala Phe
 355 360 365
 Ala Gln His Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser
 370 375 380
 Pro Ile Glu Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Ser Arg Ala Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr
 405 410 415
 Gln Ser Cys Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp
 420 425 430
 Ala Trp Glu Ser Phe Ile Ile Leu
 435 440

<210> 3
 <211> 1063
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (54) .. (704)

<400> 3

tcggccttg ggttgctgt ggtgccttg tctcctgcag gaccggccgc agc atg 56
Met
1

gac gct ccc agg cggtttccg acg ctc gtg caa ctg atg cag cca aaa 104
Asp Ala Pro Arg Arg Phe Pro Thr Leu Val Gln Leu Met Gln Pro Lys
5 10 15

gca atg cca gtg gag gtg ctc ggt cac ctc cct aag cgg ttc tcc tgg 152
Ala Met Pro Val Glu Val Leu Gly His Leu Pro Lys Arg Phe Ser Trp
20 25 30

ttc cac tct gag ttc ctg aag aat ccg aag gta gtt cgc ctt gag gtt 200
Phe His Ser Glu Phe Leu Lys Asn Pro Lys Val Val Arg Leu Glu Val
35 40 45

tgg ctg gtg gaa aag atc ttc ggc cgg ggc gga gaa cgc atc ccg cac 248
 Trp Leu Val Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Glu Arg Ile Pro His
 50 55 60 65

gtc cag ggt atg tcc caa atc ttg att cac gtg aat cga ttg gac cct 296
Val Gln Gly Met Ser Gln Ile Leu Ile His Val Asn Arg Leu Asp Pro
70 75 80

aac ggc gag gct gag atc ttg gta ttt ggg agg cct tct tac cag gag 344
 Asn Gly Glu Ala Glu Ile Leu Val Phe Gly Arg Pro Ser Tyr Gln Glu
 85 90 95

gac aca atc aag atg atc atg aac ctg gct gac tat cac cgc cag ctc 392
 Asp Thr Ile Lys Met Ile Met Asn Leu Ala Asp Tyr His Arg Gln Leu
 100 105 110

cag gcg aaa ggc tca gga aag gcc ctc gcc cag gat gtc gcc act cag 440
 Gln Ala Lys Gly Ser Gly Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Ala Thr Gln
 115 120 125

cag cgt tcg gtg gag gtc cgg gag gcc ggg acc cag cgt tcg gtg gaa 536
 Gln Arg Ser Val Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr Gln Arg Ser Val Glu
 150 155 160

gtc cag gag gtc ggg aca cag ggt tct ccg gtg gag gtg cag gag gcc 584

Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu Ala
 165 170 175

ggg acc cag cag tct ctc cag gct gcc aac aag tcg ggg acc cag cga 632
 Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln Arg
 180 185 190

tcc ccc gaa gct gcc agc aag gca gtg acc cag cggtt cgc gag gat 680
 Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu Asp
 195 200 205

gcc cggtt gac cca gtt act aga tta tgaaggcatc tcaggccctg gagccagagc 734
 Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu
 210 215

cagtcagggg ttaaagtcaa agcccgattt tccgcccaga agctgggtt ggggagagga 794

tgtggatttt ttgttttacc ctttctgttg catggttgca aacacaaact tgagttctaa 854

taaagaattt caaagtggaa gcccgcgggg cccctccccc ccgcctccct taagtccagg 914

aagctgggtt ggcgaggaag gatgatgtgg attgttttg ttttaccct tttgttgaat 974

ggttgccaac ccaaacttga gtttaataa ataattgcct ttccaaaaaa aaaaaaaaaa 1034

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1063

<210> 4

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Ala Pro Arg Arg Phe Pro Thr Leu Val Gln Leu Met Gln Pro
 1 5 10 15

Lys Ala Met Pro Val Glu Val Leu Gly His Leu Pro Lys Arg Phe Ser
 20 25 30

Trp Phe His Ser Glu Phe Leu Lys Asn Pro Lys Val Val Arg Leu Glu
 35 40 45

Val Trp Leu Val Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Gly Glu Arg Ile Pro
 50 55 60

His Val Gln Gly Met Ser Gln Ile Leu Ile His Val Asn Arg Leu Asp
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Glu Ala Glu Ile Leu Val Phe Gly Arg Pro Ser Tyr Gln

85

90

95

Glu Asp Thr Ile Lys Met Ile Met Asn Leu Ala Asp Tyr His Arg Gln
 100 105 110

Leu Gln Ala Lys Gly Ser Gly Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Ala Thr
 115 120 125

Gln Lys Ala Glu Thr Gln Arg Ser Ser Ile Glu Val Arg Glu Ala Gly
 130 135 140

Thr Gln Arg Ser Val Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr Gln Arg Ser Val
 145 150 155 160

Glu Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu
 165 170 175

Ala Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln
 180 185 190

Arg Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu
 195 200 205

Asp Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu
 210 215

<210> 5

<211> 591

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(412)

<400> 5

gccgtgcgtg gtggataagc ttgatctcgt cttccctgaa gtctggttcc ttggcagg 58

atg atg gtg acc ctc gtg acc cgt aaa gat atc ccc ccg tgg gtg aaa 106
 Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys
 1 5 10 15

gtt cct gaa gac ctg aaa gat cca gaa gta ttc cag gtc cag tcg ctg 154
 Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu
 20 25 30

gtg ctg aaa tat ctg ttt ggc cca cag gga tct cga atg tct cac atc 202
 Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile

35	40	45	
gag cag gtg agc cag gcc atg ttt gag ctg aag aac ctg gaa tct ccc Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro			250
50	55	60	
gaa gaa ctt atc gag gtc ttc att tac ggc tct caa aac aac aag att Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile			298
65	70	75	80
cgg gct aaa tgg atg ctt cag tcc atg gct gag agg tac cac ctg cgc Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg			346
85	90	95	
cag caa aaa gga gtg ctg aag ctg gag gaa tcc atg aag acc ctg gag Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu			394
100	105	110	
cta ggc cag tgt atc gag tgaagccagt ttccagtcct tgtgtctccg Leu Gly Gln Cys Ile Glu			442
115			
acctggatgc aggttaagct gtggccagtg tttggttctg gcgggatttt tagctttgtt			502
acatccttagc aagatattct ggatccctgc tgcgattct gatgtgaatc ccaaggttac			562
cactctaaat aaaaaataaa attgaagtg			591
<210> 6			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 6			
Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys			
1	5	10	15
Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu			
20	25	30	
Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile			
35	40	45	
Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro			
50	55	60	
Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile			
65	70	75	80

Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg
 85 90 95

Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu
 100 105 110

Leu Gly Gln Cys Ile Glu
 115

<210> 7

<211> 640

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (15)..(362)

<400> 7

ggcacgagga taag atg gga act ctc ccg gca cgt aga cat atc ccg ccg 50
 Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro
 1 5 10

tgg gtg aaa gtt ccc gaa gac ctg aaa gat cca gag gtg ttc cag gtc 98
 Trp Val Lys Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val
 15 20 25

cag acg cgg ctg ctg aaa gcc att ttc ggc ccg gac gga tct cga atc 146
 Gln Thr Arg Leu Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile
 30 35 40

cct tac atc gag cag gtg agc aag gcc atg ctc gag ctg aag gct ctg 194
 Pro Tyr Ile Glu Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu
 45 50 55 60

gag tct tca gac ctc acc gag gtc gtg gtt tac ggc tcc tat ttg tac 242
 Glu Ser Ser Asp Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr
 65 70 75

aag ctc cgg acc aag tgg atg ctc cag tcc atg gct gag tgg cac cgc 290
 Lys Leu Arg Thr Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg
 80 85 90

cag cgc cag gag cga ggg atg ctc aaa ctt gcc gaa gcc atg aat gcc 338
 Gln Arg Gln Glu Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala
 95 100 105

ctc gaa cta ggc cct tgg atg aag tgaaccagtt tccagccaat gcaatgaagc 392

Leu Glu Leu Gly Pro Trp Met Lys
110 115

cgggttgcag agattaggtt gtggccagag ctagagtat tccttaagct tgtttaaaa 452
tctgctccag cctaaagagt taagggaaaa ccatttggtc ccttaaagag ttaaggaaaa 512
acccttggct ctgagtcttg ttgtgaatat ttcttgatg attgttaata aaaagtgtt 572
tttctttttt cccatttta aaaataacaa taaagttta aataagtga taaaaaaaaa 632
aaaaaaaaa 640

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro Trp Val Lys Val
1 5 10 15

Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Thr Arg Leu
20 25 30

Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile Pro Tyr Ile Glu
35 40 45

Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu Glu Ser Ser Asp
50 55 60

Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Thr
65 70 75 80

Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg Gln Arg Gln Glu
85 90 95

Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala Leu Glu Leu Gly
100 105 110

Pro Trp Met Lys
115

<210> 9
<211> 1670
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (134)..(1567)

<400> 9

acttgcctgt ccaagatctg ttgaaatctg cttctacaga agaccagctg aaacaaatag 60

cttcgtggaa ctgagcacaa ctactagatt ctggacttc cgttcacagc tgccaaattgt 120

tgggagtaca ata atg gag gag tcg gaa ttg gag att ttt aga agt aag 169
Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys

1 5 10

ttt gtt aga ggc tca tct gtc acg aag cag cat gcc tgg cga aac cag 217
Phe Val Arg Gly Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln
15 20 25cac agc gag aag cgt tgc tct tcc atc agt tct ata tcc ctg gac 265
His Ser Glu Lys Arg Cys Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp
30 35 40aga atg cca tcg gaa atc ttg gtg aag ata ctt tct tac ttg gat gcg 313
Arg Met Pro Ser Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala
45 50 55 60gtg acc ttg gtg tgc att gga tgt gtg agc aga cgc ttt tat cat ttg 361
Val Thr Leu Val Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu
65 70 75gct gat gac aat ctt att tgg gtc agg aag tac gca gct gca ttt aga 409
Ala Asp Asp Asn Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg
80 85 90tca aaa aga tca cgt tgg aaa gct act tca gtg gag gaa aca gca aca 457
Ser Lys Arg Ser Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr
95 100 105agt ctg agc ttg ctg tca gtt tgg gat aaa gaa gat gga tac tgg aag 505
Ser Leu Ser Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys
110 115 120aaa gaa tat att aca aag cag atc tca tct gtg aga gca gcc ctc acc 553
Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr
125 130 135 140aac agc ctc agt cct gtc aaa cgc cgc aca agc ctt cct tcg aaa acc 601
Asn Ser Leu Ser Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr
145 150 155

aaa gag tcc ctc aga ata tct ggc tta ggt tgg aca atc atc tta aga	649
Lys Glu Ser Leu Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg	
160 165 170	
gaa gcc agt ggc aaa gaa cac atc atg cag cat tcg aat ctt tcc gta	697
Glu Ala Ser Gly Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val	
175 180 185	
aat gac aac tct gtc act gtt ttt tgg cat gac aaa aat tgg cca cat	745
Asn Asp Asn Ser Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His	
190 195 200	
gta gac acg ttg tcc acc ctg gat ttg tat ggt gcc aca cca att ttt	793
Val Asp Thr Leu Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe	
205 210 215 220	
atg gag cag tat aaa ggc cct aac aca agt tgt cca cga tgg ctg tct	841
Met Glu Gln Tyr Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser	
225 230 235	
tta att gaa aag tac gat ctg agt aat tta cgc aag tct gct atg att	889
Leu Ile Glu Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile	
240 245 250	
ggc tgc gac aga cat gtt cgg gta ttc tgt gta aat cct ggc ctc ctg	937
Gly Cys Asp Arg His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu	
255 260 265	
gtg ggg ctg tgg cag gag aat ggt gga cta gct ttt gtc atg gca aat	985
Val Gly Leu Trp Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn	
270 275 280	
att cat tcc cat ggc ctt ttc gag aga agc ata atg ggc tca gac act	1033
Ile His Ser His Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr	
285 290 295 300	
att ccc tat aca ttg cct ccc gac act aca ttt gtg gat aac tac cca	1081
Ile Pro Tyr Thr Leu Pro Pro Asp Thr Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro	
305 310 315	
gac tca atg acc ttt tat gga gat aaa ggc ttt cag ctg cat atc gac	1129
Asp Ser Met Thr Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp	
320 325 330	
att cat ggc agt aag act tac ttc ctg tgt agc acc ttc cac aat ctc	1177
Ile His Gly Ser Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu	
335 340 345	
ttc tgc agg aga gcg ggc att aac aat gga tat gtg aag ttc ttg atg	1225
Phe Cys Arg Arg Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met	

350	355	360	
ata aac tta aaa aat aac aga gaa cac cta cct ctt gtt gga aaa gtt Ile Asn Leu Lys Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val			1273
365	370	375	380
ggc ctt gaa tgg aga act gac tgt tta aat ggc cgt att gag agt tgc Gly Leu Glu Trp Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys			1321
385	390		395
att gta gtg gat atg acc ttg ctg gat gag gac aag aag ccc atc tgg Ile Val Val Asp Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Lys Pro Ile Trp	400	405	410
400	405		410
tat gtg agt tct cca gtg tgc ttg aga tct gcc tgc ctt cct gat ttc Tyr Val Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe	415	420	425
415	420		425
ccg cag ccg gct tac tct ttc gag tac atg gac agc gta gga gga gtg Pro Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Gly Val	430	435	440
430	435		440
tgc gca gac cta ggg tgg ttt gaa aat acc gat gaa tac ttc att gtc Cys Ala Asp Leu Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val	445	450	460
445	450		460
aga ctg gac att tac ctc agt gta gca aaa tta caa caa tgg ttt ggg Arg Leu Asp Ile Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly	465	470	475
465	470		475
agg caa taaatgctga gtttagcagta gggagtccttg ttattagtaa gctgtttgtt Arg Gln			1617
ttttacaact ttgttttat tgaaagttaa aataaagcat atttgtggta ttc			1670

<210> 10
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys Phe Val Arg Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln His Ser Glu Lys
 20 25 30

Arg Cys Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp Arg Met Pro Ser
 35 40 45

Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Val Thr Leu Val
 50 55 60
 Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asp Asp Asn
 65 70 75 80
 Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg Ser Lys Arg Ser
 85 90 95
 Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr Ser Leu Ser Leu
 100 105 110
 Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile
 115 120 125
 Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr Asn Ser Leu Ser
 130 135 140
 Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr Lys Glu Ser Leu
 145 150 155 160
 Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg Glu Ala Ser Gly
 165 170 175
 Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val Asn Asp Asn Ser
 180 185 190
 Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His Val Asp Thr Leu
 195 200 205
 Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe Met Glu Gln Tyr
 210 215 220
 Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser Leu Ile Glu Lys
 225 230 235 240
 Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile Gly Cys Asp Arg
 245 250 255
 His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu Val Gly Leu Trp
 260 265 270
 Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Ile His Ser His
 275 280 285
 Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr Ile Pro Tyr Thr
 290 295 300
 Leu Pro Pro Asp Thr Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro Asp Ser Met Thr

305	310	315	320
Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp Ile His Gly Ser			
325	330	335	
Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu Phe Cys Arg Arg			
340	345	350	
Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met Ile Asn Leu Lys			
355	360	365	
Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val Gly Leu Glu Trp			
370	375	380	
Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys Ile Val Val Asp			
385	390	395	400
Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Pro Ile Trp Tyr Val Ser Ser			
405	410	415	
Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe Pro Gln Pro Ala			
420	425	430	
Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Gly Val Cys Ala Asp Leu			
435	440	445	
Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val Arg Leu Asp Ile			
450	455	460	
Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly Arg Gln			
465	470	475	

<210> 11
 <211> 1665
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (21)..(1550)

<400> 11
 agggtgaact ccttgtctct atg gcg act gga cgc ggt cgg atc ttg cag cag 53
 Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln
 1 5 10

cac tgg ctc ggc ctc cag acg ctg cgc ggg ccc agc agg ggc ggt ggc 101
 His Trp Leu Gly Leu Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly

15	20	25	
gcu gca cgg ggg cgc gcc agg gcc ttt ggg tgc aga aag ggg cca ggg Ala Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly 30 35 40			149
gtc aag ctt tct gca ggc tct gct gcc ctg agg tgc cat gcc gga ggt Val Lys Leu Ser Ala Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly 45 50 55			197
gga cag cac tgg gag agc tct ttc tcc tgc tgt tct ggg ttc ctg gat Gly Gln His Trp Glu Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp 60 65 70 75			245
gga atg cct tca gaa atc ttg ctg aag ata ttt tcc tac ttg gat gct Gly Met Pro Ser Glu Ile Leu Leu Lys Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala 80 85 90			293
gtg agc ctt ctg tgt act gga tgt gtg agc agg cgc ttt tat cat cta Val Ser Leu Leu Cys Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu 95 100 105			341
gcc aat gac aat ttt att tgg atc gga atc tac tca act gct ttt tca Ala Asn Asp Asn Phe Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser 110 115 120			389
cct gca aga tca aat tgg aaa ttt aat tca gta gag aag ata gct atg Pro Ala Arg Ser Asn Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met 125 130 135			437
tct atg agc ttt ctg tca gtt cag gat aaa gaa gct ggt tat tgg aag Ser Met Ser Phe Leu Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys 140 145 150 155			485
aaa gaa tat atc aca aaa caa ata gca tct gta aaa gcc gca cta gct Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala 160 165 170			533
gac att ctc aaa cct gtc aac cct tac aca ggc ctt cca gtt aag acc Asp Ile Leu Lys Pro Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr 175 180 185			581
aaa gag gcc ctc aga ata ttt ggt tta ggt tgg gca att ata ctg aaa Lys Glu Ala Leu Arg Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys 190 195 200			629
gaa aaa ggt gga aaa gaa tat atc atg gag cat gtt gat ctt tcc ata Glu Lys Gly Gly Lys Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile 205 210 215			677

aat gac aca tca gtt act gtt ata tgg tat ggc aaa aaa tgg cca tgc	725
Asn Asp Thr Ser Val Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Lys Trp Pro Cys	
220 225 230 235	
cta gca tca ttg tca acc tta gat tta tgt ggc atg aca cca gtt ttt	773
Leu Ala Ser Leu Ser Thr Leu Asp Leu Cys Gly Met Thr Pro Val Phe	
240 245 250	
acc gac tgg tat aaa act ccc acc aaa cat aga ctc cga tgg cat tct	821
Thr Asp Trp Tyr Lys Thr Pro Thr Lys His Arg Leu Arg Trp His Ser	
255 260 265	
tta att gca aag tac aat ctg agt cat ttg acc ata tct acc atg att	869
Leu Ile Ala Lys Tyr Asn Leu Ser His Leu Thr Ile Ser Thr Met Ile	
270 275 280	
ggc tgt gac aga ctc att cgg atc ttc tgc ctg cac cct ggc ctc ctg	917
Gly Cys Asp Arg Leu Ile Arg Ile Phe Cys Leu His Pro Gly Leu Leu	
285 290 295	
gtg gga gtg tgg aag aag gag gaa gaa ctg gct ttt gtt atg gca aat	965
Val Gly Val Trp Lys Lys Glu Glu Glu Leu Ala Phe Val Met Ala Asn	
300 305 310 315	
ctt cat ttt cat cac ctt gtg gag agg agc aca tta ggc tcg gct act	1013
Leu His Phe His His Leu Val Glu Arg Ser Thr Leu Gly Ser Ala Thr	
320 325 330	
atc ccc tat gaa ctg cct cca cat agc ccc ttt ttg gat gat agc ccc	1061
Ile Pro Tyr Glu Leu Pro Pro His Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ser Pro	
335 340 345	
gag tat gga ctg cac ggc tac caa ctc cat gtt gat ctg cac agc ggt	1109
Glu Tyr Gly Leu His Gly Tyr Gln Leu His Val Asp Leu His Ser Gly	
350 355 360	
ggg gtt ttc tac cta tgt ggt aca ttt cgc aat ctc ttc acc aag aga	1157
Gly Val Phe Tyr Leu Cys Gly Thr Phe Arg Asn Leu Phe Thr Lys Arg	
365 370 375	
gga aat att gaa aat gga cat gtg aag ctc att gtt ata cat tta aaa	1205
Gly Asn Ile Glu Asn Gly His Val Lys Leu Ile Val Ile His Leu Lys	
380 385 390 395	
aat aac aga gaa cac cta cct ctt att gga aaa gtt ggc ctc tcg tgg	1253
Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Gly Leu Ser Trp	
400 405 410	
aaa act gat att ttt gat ggc tgt ata aag agt tgt tcc atg atg gac	1301
Lys Thr Asp Ile Phe Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp	

415	420	425	
gta act ctt ttg gat gaa cat ggg aaa ccc ttt tgg tgt ttc agt tcc Val Thr Leu Leu Asp Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser 430	435	440	1349
ccg gtg tgc ctg aga tcg cct gcc aca ccc tct gac agc tct agc ttc Pro Val Cys Leu Arg Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Phe 445	450	455	1397
ttg gga cag aca tac aac gtg gac tac gtt gat gcg gaa gga aga gtg Leu Gly Gln Thr Tyr Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val 460	465	470	1445
cac gtg gag ctg gtg tgg atc aga gag acc gaa tac ctt att gtc His Val Glu Leu Val Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val 480	485	490	1493
aac ctg gtc ctt tat ctt agt atc gca aaa atc aac cat tgg ttt ggg Asn Leu Val Leu Tyr Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly 495	500	505	1541
act gaa tat tagcagtagg tggcaaatta ttgttgttat ttagttgttt Thr Glu Tyr 510			1590
attttgact ggcttgttc ttgggtgtga aaattaaat aaagcaaatc tgcaaaaaaa 1650 aaaaaaaaaaa aaaaa			1665

<210> 12
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12			
Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln His Trp Leu Gly Leu 1	5	10	15
Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly Ala Ala Arg Gly Arg 20	25	30	
Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly Val Lys Leu Ser Ala 35	40	45	
Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly Gln His Trp Glu 50	55	60	
Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp Gly Met Pro Ser Glu			

65	70	75	80
Ile Leu Leu Lys Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala Val Ser Leu Leu Cys			
85		90	95
Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asn Asp Asn Phe			
100		105	110
Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ala Arg Ser Asn			
115		120	125
Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met Ser Met Ser Phe Leu			
130	135	140	
Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile Thr			
145	150	155	160
Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ile Leu Lys Pro			
165		170	175
Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr Lys Glu Ala Leu Arg			
180		185	190
Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys Glu Lys Gly Gly Lys			
195		200	205
Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile Asn Asp Thr Ser Val			
210	215		220
Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Lys Trp Pro Cys Leu Ala Ser Leu Ser			
225	230	235	240
Thr Leu Asp Leu Cys Gly Met Thr Pro Val Phe Thr Asp Trp Tyr Lys			
245		250	255
Thr Pro Thr Lys His Arg Leu Arg Trp His Ser Leu Ile Ala Lys Tyr			
260		265	270
Asn Leu Ser His Leu Thr Ile Ser Thr Met Ile Gly Cys Asp Arg Leu			
275		280	285
Ile Arg Ile Phe Cys Leu His Pro Gly Leu Leu Val Gly Val Trp Lys			
290	295		300
Lys Glu Glu Glu Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Leu His Phe His His			
305	310	315	320
Leu Val Glu Arg Ser Thr Leu Gly Ser Ala Thr Ile Pro Tyr Glu Leu			
325		330	335

Pro Pro His Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ser Pro Glu Tyr Gly Leu His
 340 345 350
 Gly Tyr Gln Leu His Val Asp Leu His Ser Gly Gly Val Phe Tyr Leu
 355 360 365
 Cys Gly Thr Phe Arg Asn Leu Phe Thr Lys Arg Gly Asn Ile Glu Asn
 370 375 380
 Gly His Val Lys Leu Ile Val Ile His Leu Lys Asn Asn Arg Glu His
 385 390 395 400
 Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Gly Leu Ser Trp Lys Thr Asp Ile Phe
 405 410 415
 Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp Val Thr Leu Leu Asp
 420 425 430
 Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg
 435 440 445
 Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Tyr
 450 455 460
 Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val His Val Glu Leu Val
 465 470 475 480
 Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val Asn Leu Val Leu Tyr
 485 490 495
 Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly Thr Glu Tyr
 500 505 510

<210> 13
 <211> 2184
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (190)..(1104)

<400> 13
 agaaaaggctg atttggttgg tgtcttgctc tttctgtggg aaggctgcgg ctcacttcct 60
 tccgacttct tgataatttt gcattagaca tttaactctt ctttctatga tctttccttc 120
 tagacactga gtttttttgt tggcctaa aacctttca gaaatccctt ccctcgccat 180

cacactgac	atg	agt	gtg	ggt	ctt	cct	ggt	ccc	cac	agt	ttg	cct	agt	tct	231	
Met	Ser	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser			
1		5							10							
gag	gaa	gca	tcg	aat	tct	ggg	aac	gcc	tca	tca	atg	cct	gca	gtt	279	
Glu	Glu	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Pro	Ala	Val	Phe	
15		20							25					30		
cat	ccc	gag	aac	tat	tct	tgc	tta	caa	ggg	tct	gct	act	gag	atg	327	
His	Pro	Glu	Asn	Tyr	Ser	Cys	Leu	Gln	Gly	Ser	Ala	Thr	Glu	Met	Leu	
												45				
tgc	aca	gag	gct	gcc	tct	cct	cgc	cct	tcc	tct	gaa	gac	ctg	cct	375	
Cys	Thr	Glu	Ala	Ala	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Leu	Pro	Leu	
												60				
caa	ggc	agc	cct	gat	tct	tct	acc	agt	ccc	aaa	caa	aag	ctc	tca	423	
Gln	Gly	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Gln	Lys	Leu	Ser	Ser	
												75				
cct	gag	gct	gac	aag	ggc	cct	gag	gag	gag	aac	aag	gtc	ctt	gcc	471	
Pro	Glu	Ala	Asp	Lys	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	Asn	Lys	Val	Leu	Ala		
												90				
agg	aag	cag	aag	atg	cgg	act	gtg	ttc	tct	cag	gcc	cag	ctg	tgt	519	
Arg	Lys	Gln	Lys	Met	Arg	Thr	Val	Phe	Ser	Gln	Ala	Gln	Leu	Cys	Ala	
												105		110		
ctc	aag	gac	agg	ttt	cag	aag	cag	aag	tac	ctc	agc	ctc	cag	cag	567	
Leu	Lys	Asp	Arg	Phe	Gln	Lys	Gln	Lys	Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Met	
												120		125		
caa	gaa	ctc	tcc	tcc	att	ctg	aac	ctg	agc	tat	aag	cag	gtt	aag	acc	615
Gln	Glu	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Lys	Thr	
												130		140		
tgg	ttt	caa	aac	caa	agg	gtg	aag	tgc	aag	cgg	tgg	cag	aaa	aac	cag	663
Trp	Phe	Gln	Asn	Gln	Arg	Val	Lys	Cys	Lys	Arg	Trp	Gln	Lys	Asn	Gln	
												145		155		
tgg	ttg	aag	act	agc	aat	ggt	ctg	att	cag	aag	ggc	tca	gca	cca	gtg	711
Trp	Leu	Lys	Thr	Ser	Asn	Gly	Leu	Ile	Gln	Lys	Gly	Ser	Ala	Pro	Val	
												160		170		
gag	tat	ccc	agc	atc	cat	tgc	agc	tat	ccc	cag	ggc	tat	ctg	gtg	aac	759
Glu	Tyr	Pro	Ser	Ile	His	Cys	Ser	Tyr	Pro	Gln	Gly	Tyr	Leu	Val	Asn	
												175		185		
gca	tct	gga	agc	ctt	tcc	atg	tgg	ggc	agc	cag	act	tgg	acc	aac	cca	807

Ala Ser Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro
195 200 205

act tgg agc agc cag acc tgg acc aac cca act tgg aac aac cag acc 855
Thr Trp Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr
210 215 220

tgg acc aac cca act tgg agc agc cag gcc tgg acc gct cag tcc tgg 903
Trp Thr Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp
225 230 235

aac ggc cag cct tgg aat gct gct ccg ctc cat aac ttc ggg gag gac 951
Asn Gly Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp
240 245 250

ttt ctg cag cct tac gta cag ttg cag caa aac ttc tct gcc agt gat 999
Phe Leu Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp
255 260 265 270

ttg gag gtg aat ttg gaa gcc act agg gaa agc cat gcg cat ttt agc 1047
Leu Glu Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser
275 280 285

acc cca caa gcc ttg gaa tta ttc ctg aac tac tct gtg act cca cca 1095
Thr Pro Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro
290 295 300

ggt gaa ata tgagacttac gcaacatctg ggcttaagt caggcaaaag 1144
Gly Glu Ile
305

ccaggttcct tccttcttcc aaatattttc atatttttt taaagatttta tttattttt 1204

atatgttaagt acactgttagc tgtcttcaga cactccagaa gagggcgtca gatcttgtt 1264

cgtatggttg tgagccacca tgtggttgct gggatttcaa ctcctgacct tcggaagagc 1324

agtccgggtgc tcttatccac tgagccatct caccagcccc tggtttattt ttttaatttt 1384

tatttgcttt ttgtttatca agacagggtt tctctgcata gctctaattt tctttgaact 1444

agctctgcag accagcctgg ccttgaactc agagatctgc ccacttatct ttgcctcctg 1504

aatgctggga ccaaagggtgg cataccacca cacctggcat atatattgtt tatttttattt 1564

tctattttta ttgggtccag agcaaaccctt ggacttagaa catgctgggc accaactcaa 1624

cttctgagct ctatttacaa ctgggtgtgt tagtgttattt gtcttagttc tgaatttgc 1684

cttttttag tgttaactct aggctttgga gacagtgagg tgcatatact ctctcccttcc 1744

caagaataag tgcttgaaca cccttaccca cgccccaccca cccatgctag tctttttct 1804
 tagaagcgtg ggtcttggta tacactgtgt cattttgagg ggtgagggtt aaaagtatat 1864
 acaaagtata acgatatggt ggctactctc gaggatgaga cagaaggacc aggagttga 1924
 gggtagctca gatatgcaat aagttcaagg ccaacctgta ctatgtttaa atagtaagac 1984
 agcatctcgta taaaataata aaactaaagt ctcaacaaaa taaaagctt cacctattaa 2044
 ggtgcttgct tgccttgaa gtccccaaag agtaactgct atgttaatat ctgttagaaag 2104
 atgttataat ttgactgtac catgatgaac cgatgccagc tggacttagtt taaacaaaaat 2164
 aaaacactaa ttttacctt 2184

<210> 14
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14
 Met Ser Val Gly Leu Pro Gly Pro His Ser Leu Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Ser Asn Ser Gly Asn Ala Ser Ser Met Pro Ala Val Phe His Pro
 20 25 30
 Glu Asn Tyr Ser Cys Leu Gln Gly Ser Ala Thr Glu Met Leu Cys Thr
 35 40 45
 Glu Ala Ala Ser Pro Arg Pro Ser Ser Glu Asp Leu Pro Leu Gln Gly
 50 55 60
 Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gln Lys Leu Ser Ser Pro Glu
 65 70 75 80
 Ala Asp Lys Gly Pro Glu Glu Glu Asn Lys Val Leu Ala Arg Lys
 85 90 95
 Gln Lys Met Arg Thr Val Phe Ser Gln Ala Gln Leu Cys Ala Leu Lys
 100 105 110
 Asp Arg Phe Gln Lys Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu
 115 120 125
 Leu Ser Ser Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe
 130 135 140

Gln Asn Gln Arg Val Lys Cys Lys Arg Trp Gln Lys Asn Gln Trp Leu
 145 150 155 160

Lys Thr Ser Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Ser Ala Pro Val Glu Tyr
 165 170 175

Pro Ser Ile His Cys Ser Tyr Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Ala Ser
 180 185 190

Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp
 195 200 205

Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr Trp Thr
 210 215 220

Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp Asn Gly
 225 230 235 240

Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp Phe Leu
 245 250 255

Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp Leu Glu
 260 265 270

Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser Thr Pro
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro Gly Glu
 290 295 300

Ile
305

<210> 15
 <211> 2114
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (217)..(1131)

<400> 15
 attataaatac tagagactcc aggatttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60
 gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat actttcctt ctggaggatcc 120

cag gga tgc ctg gtg aac ccg act ggg aac ctt cca atg tgg agc aac	810
Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn Leu Pro Met Trp Ser Asn	
185 190 195	
cag acc tgg aac aat tca acc tgg agc aac cag acc cag aac atc cag	858
Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn Gln Thr Gln Asn Ile Gln	
200 205 210	
tcc tgg agc aac cac tcc tgg aac act cag acc tgg tgc acc caa tcc	906
Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln Thr Trp Cys Thr Gln Ser	
215 220 225 230	
tgg aac aat cag gcc tgg aac agt ccc ttc tat aac tgt gga gag gaa	954
Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe Tyr Asn Cys Gly Glu Glu	
235 240 245	
tct ctg cag tcc tgc atg cag ttc cag cca aat tct cct gcc agt gac	1002
Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro Asn Ser Pro Ala Ser Asp	
250 255 260	
ttg gag gct ttg gaa gct gct ggg gaa ggc ctt aat gta ata cag	1050
Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu Gly Leu Asn Val Ile Gln	
265 270 275	
cag acc act agg tat ttt agt act cca caa acc atg gat tta ttc cta	1098
Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln Thr Met Asp Leu Phe Leu	
280 285 290	
aac tac tcc atg aac atg caa cct gaa gac gtg tgaagatgag tgaaactgat	1151
Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp Val	
295 300 305	
attactcaat ttcatgtctgg acactggctg aatccttcct ctcccctcct cccatccctc	1211
ataggatttt tcttggttgg aaaccacgtg ttctgggttc catgatgcct atccagtcaa	1271
tctcatggag ggtggagtagt ggttggagcc taatcagcga ggtttcttt ttttttttc	1331
ctattggatc ttccctggaga aaatactttt tttttttttt ttgagacgga gtcttgctct	1391
gtcgcccagg ctggagtgca gtggcgccgt cttggctcac tgcaagctcc gcctcccccgg	1451
ttcacgccccat tctcctgcct cagcctcccg agcagctggg actacaggcg cccgccaccc	1511
cggccggcta atattttgta ttttagtag agacagggtt tcactgtgtt agccaggatg	1571
gtctcgatct cctgacccctg tgatccgccc gcctcgccct ccctaacagc tgggattaca	1631
ggcgtgagcc accgcgcct gcctagaaaa gacatttaa taaccttggc tgctaaggac	1691

aacattgata gaagccgtct ctggctatacg ataagtagat ctaatactag tttggatac 1751
 ttttagggttt agaatctaac ctcaagaata agaaaatacaa gtacgaattg gtgatgaaga 1811
 tgtattcgta ttgtttggga ttgggaggct ttgcttattt ttttaaaact attgaggtaa 1871
 agggtaagc tgtaacatac ttaattgatt tcttaccgtt tttggctctg ttttgctata 1931
 tcccctaatt tgggttgtt gctaatctt gtagaaagag gtcttgatt tgctgcatcg 1991
 taatgacatg agtactactt tagttggttt aagttcaaat gaatgaaaca aatattttc 2051
 cttagttga ttttaccctg attcaccga gtgttcgat gagtaaatat acagcttaaa 2111
 cat 2114

<210> 16
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Ser Val Asp Pro Ala Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala
 1 5 10 15
 Ser Asp Cys Lys Glu Ser Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu
 20 25 30
 Glu Asn Tyr Pro Ser Leu Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr
 35 40 45
 Glu Thr Val Ser Pro Leu Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp
 50 55 60
 Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala
 65 70 75 80
 Glu Asn Ser Val Ala Lys Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Phe Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp
 100 105 110
 Arg Phe Gln Arg Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu Leu
 115 120 125
 Ser Asn Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe Gln
 130 135 140

Asn Gln Arg Met Lys Ser Lys Arg Trp Gln Lys Asn Asn Trp Pro Lys
145 150 155 160

Asn Ser Asn Gly Val Thr Gln Lys Ala Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Ser
165 170 175

Leu Tyr Ser Ser Tyr His Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn
180 185 190

Leu Pro Met Trp Ser Asn Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn
195 200 205

Gln Thr Gln Asn Ile Gln Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln
210 215 220

Thr Trp Cys Thr Gln Ser Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe
225 230 235 240

Tyr Asn Cys Gly Glu Glu Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro
245 250 255

Asn Ser Pro Ala Ser Asp Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu
260 265 270

Gly Leu Asn Val Ile Gln Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln
275 280 285

Thr Met Asp Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp
290 295 300

Val
305

<210> 17

<211> 1078

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (178)..(858)

<400> 17

caggggtcgg gcaggtggga ggggaaagct cacatctccg ccctctgctg cctctggggg 60

tagggagcat cctaaccccc aactgtccgg tcagatccgc ctactgcccc tcatcagact 120

gctactcctg ggagcacagc acctgctctt tacaccctt cttgagctg ctgggga 177

atg gct ttg cct aca aag tct agc atc ttg gac ctg agc tcc ggc acc	225
Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr	
1 5 10 15	
cca tgc acc aga tct cca gag gaa agt cac gag gct tgg gca cag tgc	273
Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys	
20 25 30	
aaa gat gct ggc agg cag cta ccc gag tac aag gca gtg gtg ggt	321
Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly	
35 40 45	
gca agt ggt gtt ggt aaa agt gct ctc acc atc cag atg act cac caa	369
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln	
50 55 60	
tgc ttc gtg aaa gac cat gac ccc act atc caa gat tcc tac tgg aag	417
Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys	
65 70 75 80	
gaa gtg gcc agg gac aac gga ggc tac att cta aat gtt ctg gat aca	465
Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr	
85 90 95	
tct ggg cag gat att cac cgg gct ctg cgt gac cag tgc ttg gca tct	513
Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser	
100 105 110	
ggt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttt gct ctt gac gac ccc tcg tct ctg	561
Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu	
115 120 125	
gac cag ttg cag cag ata tgg tcc acc tgg acc cct cac cac aag cag	609
Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln	
130 135 140	
cct ctg gta cta gtg ggc aac aag tgt gac ctg gtg acc act gct gga	657
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly	
145 150 155 160	
gat gct cat gct gcc gca gcc ctc ctt gct cac aag ttg ggg gcc ccc	705
Asp Ala His Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro	
165 170 175	
ttg gtg aag acc tca gcc aag acg cgg caa ggt gtg gag gaa gcc ttt	753
Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe	
180 185 190	
gcc ctg ctt gtc cat gag att cag agg gcc cag gag gct gtg gcc gaa	801

Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu
 195 200 205

tca agc aag aag acc cga cac cag aaa gcc gtg tgt agc tgt ggc tgc 849
 Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
 210 215 220

tct gta gcc tgaagatctt tgtctagcaa attgaccctt gtctcatgtc 898
 Ser Val Ala
 225

aaggtagacaa ttctcttgta ataagatctc cctctccgac caagttacca cagacatctt 958

tttattgtca tttggtgaga agttacgtgg taacatggga catccctcat tgactgtgtt 1018

ttatgaaact ctatgcaaaa ttaaataaaat gttttcagga ttcaaagctt cctttataacc 1078

<210> 18

<211> 227

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys
 20 25 30

Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly
 35 40 45

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser
 100 105 110

Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
 115 120 125

Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln
 130 135 140

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
 145 150 155 160
 Asp Ala His Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro
 165 170 175
 Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
 180 185 190
 Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu
 195 200 205
 Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
 210 215 220
 Ser Val Ala
 225

<210> 19
 <211> 1266
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (252)..(950)

<400> 19
 cgtgaggagg gaaggagaga tggggggacg tggacaggg agaaaacaac ataaatcata 60
 tatatatagc atgcaaattg gaaggtgatc agcacacaat aggcatcaaa taaatgttga 120
 aataatgaca cccactgtc tccttgccct caaatggtct cccctaacgt atcccctgtt 180
 gtcttgcttc ttctcttccc acttgcagag cctgctgccc acgtctcttc cctgagctgc 240
 ctgctgggtt c atg gag ctg cca aca aag cct ggc acc ttc gac ctg ggc 290
 Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly
 1 5 10

ctg gcc aca tgg agc cct tcc ttc cag ggg gaa acc cac cgg gct cag 338
 Leu Ala Thr Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln
 15 20 25

gca cgc cgc agg gat gtt ggc agg cag ctg cct gag tac aag gct gtg 386
 Ala Arg Arg Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val
 30 35 40 45

gtg	gtg	ggc	gcc	agt	ggc	gtg	ggc	aag	agt	gcg	ctg	acc	atc	cag	ctg	434
Val	Val	Gly	Ala	Ser	Gly	Val	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	
															60	
															50	
															55	
aac	cac	cag	tgc	ttc	gtg	gag	gac	cac	gac	ccc	acc	atc	cag	gat	tcc	482
Asn	His	Gln	Cys	Phe	Val	Glu	Asp	His	Asp	Pro	Thr	Ile	Gln	Asp	Ser	
															75	
															65	
															70	
tac	tgg	aag	gag	ttg	acc	ctg	gac	agt	ggg	gac	tgc	att	ctg	aat	gtg	530
Tyr	Trp	Lys	Glu	Leu	Thr	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Cys	Ile	Leu	Asn	Val	
															80	
															85	
															90	
ctg	gac	aca	gca	ggg	cag	gcc	atc	cat	agg	gcc	ctg	cgt	gac	cag	tgc	578
Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Ala	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Asp	Gln	Cys	
															95	
															100	
															105	
ctg	gct	gtc	tgt	gat	ggt	gtg	ctg	ggc	gtc	ttc	gct	ctc	gat	gac	ccc	626
Leu	Ala	Val	Cys	Asp	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Leu	Asp	Asp	Pro	
															110	
															115	
															120	
															125	
tcg	tct	ctg	atc	cag	ctg	cag	cag	ata	tgg	gcc	acc	tgg	ggc	cct	cac	674
Ser	Ser	Leu	Ile	Gln	Leu	Gln	Ile	Trp	Ala	Thr	Trp	Gly	Pro	His		
															130	
															135	
															140	
ccc	gcc	cag	ccc	ctt	gtc	ctc	gtg	ggc	aac	aag	tgt	gac	ctt	gtg	acc	722
Pro	Ala	Gln	Pro	Leu	Val	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Cys	Asp	Leu	Val	Thr	
															145	
															150	
															155	
act	gct	gga	gat	gct	cat	gcc	gct	gca	gcc	ctc	gca	cac	agc	tgg	770	
Thr	Ala	Gly	Asp	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	His	Ser	Trp	
															160	
															165	
															170	
ggg	gcc	cac	ttc	gtg	gag	acc	tcg	gcc	aaa	aca	cgg	caa	ggc	gtg	gag	818
Gly	Ala	His	Phe	Val	Glu	Thr	Ser	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Gly	Val	Glu	
															175	
															180	
															185	
gag	gcc	ttt	tcc	ctg	ctg	gtc	cat	gag	atc	cag	agg	gtc	cag	gag	gcc	866
Glu	Ala	Phe	Ser	Leu	Leu	Val	His	Glu	Ile	Gln	Arg	Val	Gln	Glu	Ala	
															190	
															195	
															200	
															205	
atg	gcg	aag	gag	ccc	atg	gca	agg	tcc	tgt	agg	gag	aag	acc	cgg	cac	914
Met	Ala	Lys	Glu	Pro	Met	Ala	Arg	Ser	Cys	Arg	Glu	Lys	Thr	Arg	His	
															210	
															215	
															220	
cag	aag	gcc	acc	tgc	cac	tgt	ggc	tgc	tct	gtg	gcc	tgaaggctt				960
Gln	Lys	Ala	Thr	Cys	His	Cys	Gly	Cys	Ser	Val	Ala					
															225	
															230	
ggccaagaaa	tgttagacctt	tcccccaggcc	agggtgattt	ttcatttgac	atgagacccc											1020

tgaggcaact agcttgagg gacacatcag gtatactagg gaaagatgga catctcttt 1080
 gtttcactt ggtgaggggc ttttggtaa catggagtg cctaatgttgc ttttgttat 1140
 gtcaagttga aagattttgt gcaaaattaa ataaatggtg ttttgggttt caaagctgcc 1200
 tccatgccga gtgttgtgtg ggtggagtg agactggta gaatgttact tgagttgtga 1260
 gaattc 1266

<210> 20

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met	Glu	Leu	Pro	Thr	Lys	Pro	Gly	Thr	Phe	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Thr
1															15

Trp	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Glu	Thr	His	Arg	Ala	Gln	Ala	Arg	Arg
															30
20															

Arg	Asp	Val	Gly	Arg	Gln	Leu	Pro	Glu	Tyr	Lys	Ala	Val	Val	Val	Gly
															45
35															

Ala	Ser	Gly	Val	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Asn	His	Gln
															60
50															

Cys	Phe	Val	Glu	Asp	His	Asp	Pro	Thr	Ile	Gln	Asp	Ser	Tyr	Trp	Lys
															80
65															

Glu	Leu	Thr	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Cys	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Asp	Thr
															95
85															

Ala	Gly	Gln	Ala	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Asp	Gln	Cys	Leu	Ala	Val
															110
100															

Cys	Asp	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Leu	Asp	Asp	Pro	Ser	Ser	Leu
															125
115															

Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ile	Trp	Ala	Thr	Trp	Gly	Pro	His	Pro	Ala	Gln
															140
130															

Pro	Leu	Val	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Cys	Asp	Leu	Val	Thr	Thr	Ala	Gly
															160
145															

Asp	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	His	Ser	Trp	Gly	Ala	His	
															175
165															

Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
 180 185 190

Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys
 195 200 205

Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His Gln Lys Ala
 210 215 220

Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala
 225 230

<210> 21

<211> 1063

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (177)..(872)

<400> 21

gatacaaatt cgaatgtagg tgcttaggcgc gcttgtgtta gagtgttgt tagggagac 60

tgtatggaatc cacagtccaa ttagtacagg gcctgtcctc cgtgtggcag cttcacccgg 120

gagttgctgg cctggctgcc tacctgctt cctgagatcc agggactttt cccaga atg 179
 Met

1

gct ttg ggt gac ctc ctg ctg tct gtc ctc tct gcc cag gaa atg aat 227
 Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Ala Gln Glu Met Asn
 5 10 15

gcc ctt cgt ggc cag gtg ggc ggg gac gtc aat gtg gag atg gac gcc 275
 Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Asp Val Asn Val Glu Met Asp Ala
 20 25 30

gcc ccc ggt gtg gac ctg agc cgc atc ctg aac gag atg cgg gat cag 323
 Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met Arg Asp Gln
 35 40 45

tat gag aag atg gcg gag aag aac cgc aag gat gct gag gaa tgg ttc 371
 Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu Glu Trp Phe
 50 55 60 65

ttc acc aag aca gag gag ctg aac cga gaa gtg gcc acc aac acg gag 419

Phe	Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Leu	Asn	Arg	Glu	Val	Ala	Thr	Asn	Thr	Glu	
70																80
gcc ctg cag agc agc cggtt gca gag atc acg gag ctc cgc cgc tct gtg															467	
Ala	Leu	Gln	Ser	Ser	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Arg	Ser	Val	
85																95
cag aac ctg gag att gag ctg cag tcc cag ctc agc atg aaa gca tca															515	
Gln	Asn	Leu	Glu	Ile	Glu	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Ser	Met	Lys	Ala	Ser	
100																110
ctg gag aac agc ctg gca gag aca gag gcg cgc tat ggg gcc cag ctg															563	
Leu	Glu	Asn	Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Ala	Arg	Tyr	Gly	Ala	Gln	Leu	
115																125
gcg cag ctg cag ggc ctc att agc agt gtg gaa cag cag ctg tgt gag															611	
Ala	Gln	Leu	Gln	Gly	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Gln	Gln	Leu	Cys	Glu	
130																145
ctg cgt tgt gac atg gaa agg cag aat cat gag tac cag gtg ctg ctg															659	
Leu	Arg	Cys	Asp	Met	Glu	Arg	Gln	Asn	His	Glu	Tyr	Gln	Val	Leu	Leu	
150																160
gat gtg aag acc cga ctg gag cag gag atc gcc acc tac cgc cgt ctg															707	
Asp	Val	Lys	Thr	Arg	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Thr	Tyr	Arg	Arg	Leu	
165																175
ctg gag ggc gag gac gcc cac ctg gct act caa tac tcc tca tcc ctg															755	
Leu	Glu	Gly	Glu	Asp	Ala	His	Leu	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Ser	Ser	Leu	
180																190
gct tcg cag ccc tcc cga gaa ggc atg gtg acc agc cgc cag gtg cgc															803	
Ala	Ser	Gln	Pro	Ser	Arg	Glu	Gly	Met	Val	Thr	Ser	Arg	Gln	Val	Arg	
195																205
acc att gtg gag gaa gtc cag gat ggt aag gtg ttt tcc tcc aga gag															851	
Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Val	Gln	Asp	Gly	Lys	Val	Phe	Ser	Ser	Arg	Glu	
210																225
cag gag cac cgc tcc acc cac tgaggcccct gtctgcgtat gatagcccgag															902	
Gln	Glu	His	Arg	Ser	Thr	His										
230																
gcccaggacc ttaggctgca gctccctgca tctactgccaa agcctgaact cctatgagct															962	
agctgttgcc ttctgtgttt gctttgtgct gccccttaca gagaggcccc ttgggttgac															1022	
cccagaaatt gctaataaag ctttgaagaa gtctgatcct t															1063	

<210> 22
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22
 Met Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Ala Gln Glu Met
 1 5 10 15
 Asn Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Asp Val Asn Val Glu Met Asp
 20 25 30
 Ala Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met Arg Asp
 35 40 45
 Gln Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu Glu Trp
 50 55 60
 Phe Phe Thr Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr Asn Thr
 65 70 75 80
 Glu Ala Leu Gln Ser Ser Arg Thr Glu Ile Thr Glu Leu Arg Arg Ser
 85 90 95
 Val Gln Asn Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asn Ser Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Tyr Gly Ala Gln
 115 120 125
 Leu Ala Gln Leu Gln Gly Leu Ile Ser Ser Val Glu Gln Gln Leu Cys
 130 135 140
 Glu Leu Arg Cys Asp Met Glu Arg Gln Asn His Glu Tyr Gln Val Leu
 145 150 155 160
 Leu Asp Val Lys Thr Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Arg
 165 170 175
 Leu Leu Glu Gly Glu Asp Ala His Leu Ala Thr Gln Tyr Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Ala Ser Gln Pro Ser Arg Glu Gly Met Val Thr Ser Arg Gln Val
 195 200 205
 Arg Thr Ile Val Glu Glu Val Gln Asp Gly Lys Val Phe Ser Ser Arg
 210 215 220
 Glu Gln Glu His Arg Ser Thr His
 225 230

<210> 23
<211> 1670
<212> DNA
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (139)..(1401)

<400> 23
gacaccctca accccatcat cccaggccct cataggctcc atccagcatt acgtcctcat 60
ccctacctac gggttctgac gaccctgctg tcacacccgc catcccttgg acgcagaccc 120
ttctagccga ttacatca atg ggt tcc cgg gag aca cct tct tgc tct 171
Met Gly Ser Arg Glu Thr Pro Ser Ser Cys Ser
1 5 10
aag acc ctt gaa acc ttg gac ctg gag act tcc gac agc tct agc cct 219
Lys Thr Leu Glu Thr Leu Asp Leu Glu Thr Ser Asp Ser Ser Pro
15 20 25
gat gct gac agt cct ctg gaa gag caa tgg ctg aaa tcc tcc cca gcc 267
Asp Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Trp Leu Lys Ser Ser Pro Ala
30 35 40
ctg aag gag gac agt gtg gat gtg gta ctg gaa gac tgc aaa gag cct 315
Leu Lys Glu Asp Ser Val Asp Val Val Leu Glu Asp Cys Lys Glu Pro
45 50 55
ctg tcc ccc tcc tcg cct ccg aca ggc aga gag atg atc agg tac gaa 363
Leu Ser Pro Ser Pro Pro Thr Gly Arg Glu Met Ile Arg Tyr Glu
60 65 70 75
gtc aaa gtg aac cga cgg agc att gaa gac atc tgc ctc tgc tgt gga 411
Val Lys Val Asn Arg Arg Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Cys Cys Gly
80 85 90
act ctc cag gtg tac act cgg cac ccc ttg ttt gag gga ggg tta tgt 459
Thr Leu Gln Val Tyr Thr Arg His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Leu Cys
95 100 105
gcc cca tgt aag gat aag ttc ctg gag tcc ctc ttc ctg tat gat gat 507
Ala Pro Cys Lys Asp Lys Phe Leu Glu Ser Leu Phe Leu Tyr Asp Asp
110 115 120
gat gga cac cag agt tac tgc acc atc tgc tgt tcc ggg ggt acc ctg 555

Asp	Gly	His	Gln	Ser	Tyr	Cys	Thr	Ile	Cys	Cys	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu		
125																	
ttc	atc	tgt	gag	agc	ccc	gac	tgt	acc	aga	tgc	tac	tgt	ttc	gag	tgt	603	
Phe	Ile	Cys	Glu	Ser	Pro	Asp	Cys	Thr	Arg	Cys	Tyr	Cys	Phe	Glu	Cys		
140																155	
gtg	gac	atc	ctg	gtg	ggc	ccc	ggg	acc	tca	gag	agg	atc	aat	gcc	atg	651	
Val	Asp	Ile	Leu	Val	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Arg	Ile	Asn	Ala	Met		
160																170	
gcc	tgc	tgg	gtt	tgc	ttc	ctg	tgc	ctg	ccc	ttc	tca	cgg	agt	gga	ctg	699	
Ala	Cys	Trp	Val	Cys	Phe	Leu	Cys	Leu	Pro	Phe	Ser	Arg	Ser	Gly	Leu		
175																185	
ctg	cag	agg	cgc	aag	agg	tgg	cgg	cac	cag	ctg	aag	gcc	ttc	cat	gat	747	
Leu	Gln	Arg	Arg	Lys	Arg	Trp	Arg	His	Gln	Leu	Lys	Ala	Phe	His	Asp		
190																200	
caa	gag	gga	gcg	ggc	cct	atg	gag	ata	tac	aag	aca	gtg	tct	gca	tgg	795	
Gln	Glu	Gly	Ala	Gly	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr	Lys	Thr	Val	Ser	Ala	Trp		
205																215	
aag	aga	cag	cca	gtg	cgg	gta	ctg	agc	ctt	ttt	aga	aat	att	gat	aaa	843	
Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Arg	Val	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Asn	Ile	Asp	Lys		
220																235	
gta	cta	aag	agt	ttg	ggc	ttt	ttg	gaa	agc	ggt	tct	ggt	tct	ggg	gga	891	
Val	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Glu	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly		
240																250	
gga	acg	ctg	aag	tac	gtg	gaa	gat	gtc	aca	aat	gtc	gtg	agg	aga	gac	939	
Gly	Thr	Leu	Lys	Tyr	Val	Glu	Asp	Val	Thr	Asn	Val	Val	Arg	Arg	Asp		
255																265	
gtg	gag	aaa	tgg	ggc	ccc	ttt	gac	ctg	gtg	tac	ggc	tcg	acg	cag	ccc	987	
Val	Glu	Lys	Trp	Gly	Pro	Phe	Asp	Leu	Val	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Pro		
270																280	
cta	ggc	agc	tct	tgt	gat	cgc	tgt	ccc	ggc	tgg	tac	atg	ttc	cag	ttc	1035	
Leu	Gly	Ser	Ser	Cys	Asp	Arg	Cys	Pro	Gly	Trp	Tyr	Met	Phe	Gln	Phe		
285																295	
cac	cg	atc	ctg	cag	tat	g	cg	ctg	cct	cgc	cag	gag	agt	cag	cg	1083	
His	Arg	Ile	Leu	Gln	Tyr	Ala	Leu	Pro	Arg	Gln	Glu	Ser	Gln	Arg	Pro		
300																315	
ttc	ttc	tgg	ata	ttc	atg	gac	aat	ctg	ctg	ctg	act	gag	gat	gac	caa	1131	
Phe	Phe	Trp	Ile	Phe	Met	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Glu	Asp	Asp	Gln	
320																330	

gag aca act acc cgc ttc ctt cag aca gag gct gtg acc ctc cag gat	1179
Glu Thr Thr Thr Arg Phe Leu Gln Thr Glu Ala Val Thr Leu Gln Asp	
335 340 345	
gtc cgt ggc aga gac tac cag aat gct atg cggtg tgg agc aac att	1227
Val Arg Gly Arg Asp Tyr Gln Asn Ala Met Arg Val Trp Ser Asn Ile	
350 355 360	
cca ggg ctg aag agc aag cat gcg ccc ctg acc cca aag gaa gaa gag	1275
Pro Gly Leu Lys Ser Lys His Ala Pro Leu Thr Pro Lys Glu Glu Glu	
365 370 375	
tat ctg caa gcc caa gtc aga agc agg agc aag ctg gac gcc ccg aaa	1323
Tyr Leu Gln Ala Gln Val Arg Ser Arg Ser Lys Leu Asp Ala Pro Lys	
380 385 390 395	
gtt gac ctc ctg gtg aag aac tgc ctt ctc ccg ctg aga gag tac ttc	1371
Val Asp Leu Leu Val Lys Asn Cys Leu Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe	
400 405 410	
aag tat ttt tct caa aac tca ctt cct ctt tagaaatgaa tcaccataag	1421
Lys Tyr Phe Ser Gln Asn Ser Leu Pro Leu	
415 420	
atgaaagtct ttccctagaac cagggcagat ttcttcctaa ggtctcttcc ctccacagtt	1481
ttctctggtt tgcttcagg cttcgggtt tcttcctgt ttgattgcca ggatgcctct	1541
gtcagctca cttgcgggg tggaggtgc ctacggctct gcacaagttc ccggtgggat	1601
aacctgccat gttctctga aactgtgtgt acctgttg aagttttca aatatatcat	1661
aggattgtt	1670

<210> 24
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24
 Met Gly Ser Arg Glu Thr Pro Ser Ser Cys Ser Lys Thr Leu Glu Thr
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Glu Thr Ser Asp Ser Ser Ser Pro Asp Ala Asp Ser Pro
 20 25 30

Leu Glu Glu Gln Trp Leu Lys Ser Ser Pro Ala Leu Lys Glu Asp Ser
 35 40 45

Val Asp Val Val Leu Glu Asp Cys Lys Glu Pro Leu Ser Pro Ser Ser
 50 55 60

Pro Pro Thr Gly Arg Glu Met Ile Arg Tyr Glu Val Lys Val Asn Arg
 65 70 75 80

Arg Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Cys Cys Gly Thr Leu Gln Val Tyr
 85 90 95

Thr Arg His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Leu Cys Ala Pro Cys Lys Asp
 100 105 110

Lys Phe Leu Glu Ser Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Asp Gly His Gln Ser
 115 120 125

Tyr Cys Thr Ile Cys Cys Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ile Cys Glu Ser
 130 135 140

Pro Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ile Leu Val
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Thr Ser Glu Arg Ile Asn Ala Met Ala Cys Trp Val Cys
 165 170 175

Phe Leu Cys Leu Pro Phe Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Lys
 180 185 190

Arg Trp Arg His Gln Leu Lys Ala Phe His Asp Gln Glu Gly Ala Gly
 195 200 205

Pro Met Glu Ile Tyr Lys Thr Val Ser Ala Trp Lys Arg Gln Pro Val
 210 215 220

Arg Val Leu Ser Leu Phe Arg Asn Ile Asp Lys Val Leu Lys Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Phe Leu Glu Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Lys Tyr
 245 250 255

Val Glu Asp Val Thr Asn Val Val Arg Arg Asp Val Glu Lys Trp Gly
 260 265 270

Pro Phe Asp Leu Val Tyr Gly Ser Thr Gln Pro Leu Gly Ser Ser Cys
 275 280 285

Asp Arg Cys Pro Gly Trp Tyr Met Phe Gln Phe His Arg Ile Leu Gln
 290 295 300

Tyr Ala Leu Pro Arg Gln Glu Ser Gln Arg Pro Phe Phe Trp Ile Phe

305	310	315	320
Met Asp Asn Leu Leu Leu Thr Glu Asp Asp Gln Glu Thr Thr Thr Arg			
	325	330	335
Phe Leu Gln Thr Glu Ala Val Thr Leu Gln Asp Val Arg Gly Arg Asp			
	340	345	350
Tyr Gln Asn Ala Met Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser			
	355	360	365
Lys His Ala Pro Leu Thr Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Leu Gln Ala Gln			
	370	375	380
Val Arg Ser Arg Ser Lys Leu Asp Ala Pro Lys Val Asp Leu Leu Val			
	385	390	395
Lys Asn Cys Leu Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Gln			
	405	410	415
Asn Ser Leu Pro Leu			
	420		

<210> 25
 <211> 1705
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (485)..(1645)

<400> 25
 cccatctcca cccctccctt gaacccactt ccccactgag gtccccaac cccacccctc 60
 actccaccctt gagggcccca tcctctgaac cccaatcccc cagccccactt gagctcttaa 120
 ccctccccac ctgagggttc ctttccctt cccgtcccc agcttcctag ctccccaccc 180
 caagtacccccc cccgcagctc ctgcacccctc ccactgaaaa ccggcactga agggctgccc 240
 cgccccggcc cctccccggcc cccgcgggac acgcccagat tctttcccc catagcctgg 300
 tgacctctgg ccacccgctt tcccaagggtgg gcctggatcc ttccagctca ttctttgcct 360
 gcgccgtccc tcgttccatg gcccagtcctt ccccggggac cctgagcctg gaagccccgg 420
 accactggaa ctttgaaccc accagctggc tgtaccggaa gccgtggcag cagccctcat 480

cccc atg gcg gcc atc cca gcc ctg gac cca gag gcc gag ccc agc atg	529
Met Ala Ala Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Ala Glu Pro Ser Met	
1 5 10 15	
gac gtg att ttg gtg gga tcc agt gag ctc tca agc tcc gtt tca ccc	577
Asp Val Ile Leu Val Gly Ser Ser Glu Leu Ser Ser Val Ser Pro	
20 25 30	
ggg aca ggc aga gat ctt att gca tat gaa gtc aag gct aac cag cga	625
Gly Thr Gly Arg Asp Leu Ile Ala Tyr Glu Val Lys Ala Asn Gln Arg	
35 40 45	
aat ata gaa gac atc tgc atc tgc tgc gga agt ctc cag gtt cac aca	673
Asn Ile Glu Asp Ile Cys Ile Cys Cys Ser Leu Gln Val His Thr	
50 55 60	
cag cac cct ctg ttt gag gga ggg atc tgc gcc cca tgt aag gac aag	721
Gln His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Cys Lys Asp Lys	
65 70 75	
ttc ctg gat gcc ctc ttc ctg tac gac gat gac ggg tac caa tcc tac	769
Phe Leu Asp Ala Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr	
80 85 90 95	
tgc tcc atc tgc tcc gga gag acg ctg ctc atc tgc gga aac cct	817
Cys Ser Ile Cys Cys Ser Gly Glu Thr Leu Leu Ile Cys Gly Asn Pro	
100 105 110	
gat tgc acc cga tgc tac tgc ttc gag tgt gtg gat agc ctg gtc ggc	865
Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ser Leu Val Gly	
115 120 125	
ccc ggg acc tcg ggg aag gtg cac gcc atg agc aac tgg gtg tgc tac	913
Pro Gly Thr Ser Gly Lys Val His Ala Met Ser Asn Trp Val Cys Tyr	
130 135 140	
ctg tgc ctg ccg tcc tcc cga agc ggg ctg ctg cag cgt cgg agg aag	961
Leu Cys Leu Pro Ser Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Arg Lys	
145 150 155	
tgg cgc agc cag ctc aag gcc ttc tac gac cga gag tcg gag aat ccc	1009
Trp Arg Ser Gln Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Glu Ser Glu Asn Pro	
160 165 170 175	
ctt gag atg ttc gaa acc gtg cct gtg tgg agg aga cag cca gtc cgg	1057
Leu Glu Met Phe Glu Thr Val Pro Val Trp Arg Arg Gln Pro Val Arg	
180 185 190	
gtg ctg tcc ctt ttt gaa gac atc aag aaa gag ctg acg agt ttg ggc	1105

Val	Leu	Ser	Leu	Phe	Glu	Asp	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	
							195		200					205		
ttt	ttg	gaa	agt	ggt	tct	gac	ccg	gga	caa	ctg	aag	cat	gtg	gtt	gat	1153
Phe	Leu	Glu	Ser	Gly	Ser	Asp	Pro	Gly	Gln	Leu	Lys	His	Val	Val	Asp	
							210		215				220			
gtc	aca	gac	aca	gtg	agg	aag	gat	gtg	gag	gag	tgg	gga	ccc	ttc	gat	1201
Val	Thr	Asp	Thr	Val	Arg	Lys	Asp	Val	Glu	Glu	Trp	Gly	Pro	Phe	Asp	
							225		230			235				
ctt	gtg	tac	ggc	gcc	aca	gct	ccc	ctg	ggc	cac	acc	tgt	gac	cgt	cct	1249
Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ala	Pro	Leu	Gly	His	Thr	Cys	Asp	Arg	Pro	
							240		245		250		255			
ccc	agc	tgg	tac	ctg	ttc	cag	ttc	cac	cg	ttc	ctg	cag	tac	gca	cg	1297
Pro	Ser	Trp	Tyr	Leu	Phe	Gln	Phe	His	Arg	Phe	Leu	Gln	Tyr	Ala	Arg	
							260		265			270				
ccc	aag	cca	ggc	agc	ccc	agg	ccc	ttc	ttc	tgg	atg	ttc	gtg	gac	aat	1345
Pro	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Pro	Phe	Phe	Trp	Met	Phe	Val	Asp	Asn	
							275		280			285				
ctg	gtg	ctg	aac	aag	gaa	gac	ctg	gac	gtc	gca	tct	cgc	ttc	ctg	gag	1393
Leu	Val	Leu	Asn	Lys	Glu	Asp	Leu	Asp	Val	Ala	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	
							290		295			300				
atg	gag	cca	gtc	acc	atc	cca	gat	gtc	cac	gg	tcc	ttg	cag	aat		1441
Met	Glu	Pro	Val	Thr	Ile	Pro	Asp	Val	His	Gly	Gly	Ser	Leu	Gln	Asn	
							305		310			315				
gct	gtc	cgc	gtg	tgg	agc	aac	atc	cca	gcc	ata	agg	agc	agc	agg	cac	1489
Ala	Val	Arg	Val	Trp	Ser	Asn	Ile	Pro	Ala	Ile	Arg	Ser	Ser	Arg	His	
							320		325		330		335			
tgg	gct	ctg	gtt	tcg	gaa	gaa	ttg	tcc	ctg	ctg	gcc	cag	aac	aag		1537
Trp	Ala	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Gln	Asn	Lys		
							340		345			350				
cag	agc	tcg	aag	ctc	gcg	gcc	aag	tgg	ccc	acc	aag	ctg	gtg	aag	aac	1585
Gln	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala	Lys	Trp	Pro	Thr	Lys	Leu	Val	Lys	Asn	
							355		360			365				
tgc	ttt	ctc	ccc	cta	aga	gaa	tat	ttc	aag	tat	ttt	tca	aca	gaa	ctc	1633
Cys	Phe	Leu	Pro	Leu	Arg	Glu	Tyr	Phe	Lys	Tyr	Phe	Ser	Thr	Glu	Leu	
							370		375			380				
act	tcc	tct	tta	taaatgagtc	actatactgt	gaagaaaaag	acttttccta									1685
Thr	Ser	Ser	Leu													
							385									

gaacaaaggc aactttcctc 1705

<210> 26

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Ala Ala Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Ala Glu Pro Ser Met Asp
1 5 10 15

Val Ile Leu Val Gly Ser Ser Glu Leu Ser Ser Ser Val Ser Pro Gly
20 25 30

Thr Gly Arg Asp Leu Ile Ala Tyr Glu Val Lys Ala Asn Gln Arg Asn
35 40 45

Ile Glu Asp Ile Cys Ile Cys Cys Gly Ser Leu Gln Val His Thr Gln
50 55 60

His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Cys Lys Asp Lys Phe
65 70 75 80

Leu Asp Ala Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Cys Cys Ser Gly Glu Thr Leu Leu Ile Cys Gly Asn Pro Asp
100 105 110

Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ser Leu Val Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Ser Gly Lys Val His Ala Met Ser Asn Trp Val Cys Tyr Leu
130 135 140

Cys Leu Pro Ser Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Arg Lys Trp
145 150 155 160

Arg Ser Gln Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Glu Ser Glu Asn Pro Leu
165 170 175

Glu Met Phe Glu Thr Val Pro Val Trp Arg Arg Gln Pro Val Arg Val
180 185 190

Leu Ser Leu Phe Glu Asp Ile Lys Lys Glu Leu Thr Ser Leu Gly Phe
195 200 205

Leu Glu Ser Gly Ser Asp Pro Gly Gln Leu Lys His Val Val Asp Val

210	215	220
Thr Asp Thr Val Arg Lys Asp Val Glu Glu Trp Gly Pro Phe Asp Leu		
225	230	235
Val Tyr Gly Ala Thr Ala Pro Leu Gly His Thr Cys Asp Arg Pro Pro		
245	250	255
Ser Trp Tyr Leu Phe Gln Phe His Arg Phe Leu Gln Tyr Ala Arg Pro		
260	265	270
Lys Pro Gly Ser Pro Arg Pro Phe Phe Trp Met Phe Val Asp Asn Leu		
275	280	285
Val Leu Asn Lys Glu Asp Leu Asp Val Ala Ser Arg Phe Leu Glu Met		
290	295	300
Glu Pro Val Thr Ile Pro Asp Val His Gly Gly Ser Leu Gln Asn Ala		
305	310	315
320		
Val Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Ala Ile Arg Ser Ser Arg His Trp		
325	330	335
Ala Leu Val Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Ala Gln Asn Lys Gln		
340	345	350
Ser Ser Lys Leu Ala Ala Lys Trp Pro Thr Lys Leu Val Lys Asn Cys		
355	360	365
Phe Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Thr Glu Leu Thr		
370	375	380
Ser Ser Leu		
385		

<210> 27
 <211> 1560
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (147)..(1367)

<400> 27
 ggtgcatgct agggcttac gaaggctgggt ggtgcagagg ctcccaaggcc aggtctttt 60
 gtcgggtggtg agggacgctc actctcactc cgcggtgtgt ctccccgtct gtgtgctgtg 120

atctcctctg	tgagagaagg	gccagg	atg	ttc	gag	gtc	ctg	gtg	ctg	aag	att	173						
			Met	Phe	Glu	Val	Leu	Val	Leu	Lys	Ile							
			1				5											
gaa	gat	cca	ggt	tgc	ttc	tgg	gta	att	ata	aaa	gga	tgt	agt	cat	ttt	221		
			Glu	Asp	Pro	Gly	Cys	Phe	Trp	Val	Ile	Ile	Lys	Gly	Cys	Ser	His	Phe
10				15				20					25					
tta	gaa	caa	gaa	gtt	gac	tac	caa	aaa	cta	aac	act	gcc	atg	aat	gac	269		
Leu	Glu	Gln	Glu	Val	Asp	Tyr	Gln	Lys	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Asn	Asp			
					30				35			40						
ttc	tat	aac	agc	atg	tgt	cag	gac	gta	gaa	atg	aaa	cca	tta	atg	ctg	317		
Phe	Tyr	Asn	Ser	Met	Cys	Gln	Asp	Val	Glu	Met	Lys	Pro	Leu	Met	Leu			
				45			50			55								
gaa	gaa	ggg	cag	gtg	tgt	gtg	gtg	tac	tgc	cag	gag	ctg	aag	tgc	tgg	365		
Glu	Glu	Gly	Gln	Val	Cys	Val	Val	Tyr	Cys	Gln	Glu	Leu	Lys	Cys	Trp			
				60			65			70								
tgc	agg	gct	ctg	att	aag	tcc	atc	atc	tct	tct	gca	gac	cat	tac	ctg	413		
Cys	Arg	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	Ile	Ile	Ser	Ser	Ala	Asp	His	Tyr	Leu			
				75			80			85								
gca	gag	tgt	ttc	ctg	gtc	gat	ttt	gcc	aag	tat	att	cca	gta	aaa	tct	461		
Ala	Glu	Cys	Phe	Leu	Val	Asp	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Pro	Val	Lys	Ser			
				90			95			100			105					
aaa	aac	atc	cga	gtt	gca	gta	gag	tct	ttt	atg	cag	ctt	cct	tac	aga	509		
Lys	Asn	Ile	Arg	Val	Ala	Val	Glu	Ser	Phe	Met	Gln	Leu	Pro	Tyr	Arg			
				110			115			120								
gca	aaa	aaa	ttc	aga	ctt	tac	ggt	aca	aag	cct	gtg	aca	ttg	cac	att	557		
Ala	Lys	Lys	Phe	Arg	Leu	Tyr	Gly	Thr	Lys	Pro	Val	Thr	Leu	His	Ile			
				125			130			135								
gac	ttc	tgt	gaa	gac	aat	gct	gag	att	gta	cct	gcc	aca	aaa	tgg	gac	605		
Asp	Phe	Cys	Glu	Asp	Asn	Ala	Glu	Ile	Val	Pro	Ala	Thr	Lys	Trp	Asp			
				140			145			150								
agt	gca	gcc	atc	cag	tac	ttt	cag	aac	ctt	cta	aga	gca	act	acc	caa	653		
Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Tyr	Phe	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Thr	Thr	Gln			
				155			160			165								
gtg	gaa	gca	aaa	cta	tgt	gcg	gtg	gaa	gaa	gat	act	ttt	gag	gtt	tac	701		
Val	Glu	Ala	Lys	Leu	Cys	Ala	Val	Glu	Glu	Asp	Thr	Phe	Glu	Val	Tyr			
				170			175			180			185					
ctt	tat	gca	aca	ata	aaa	aat	gaa	aaa	gtt	tgt	gtt	aat	gat	gac	cta	749		

gca gac ctg aag aag gtg aac atg ttc tta aag cca gac tcc 1367
 Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser
 395 400 405

tgacgacatg ccagccctt ccaacacaga gtgttgctt gtttgctt gtctgttctg 1427
 ttctaagagt gacggggatg aaatacaggg cttgcgcgt cctggcatg cattcatcac 1487
 tgaaccatac cccaattcca taggaggatt ttaaataaac acttctaagg ctacattgca 1547
 gaattcttgc tcc 1560

<210> 28
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28
 Met Phe Glu Val Leu Val Leu Lys Ile Glu Asp Pro Gly Cys Phe Trp
 1 5 10 15

Val Ile Ile Lys Gly Cys Ser His Phe Leu Glu Gln Glu Val Asp Tyr
 20 25 30

Gln Lys Leu Asn Thr Ala Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Met Cys Gln
 35 40 45

Asp Val Glu Met Lys Pro Leu Met Leu Glu Glu Gly Gln Val Cys Val
 50 55 60

Val Tyr Cys Gln Glu Leu Lys Cys Trp Cys Arg Ala Leu Ile Lys Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp
 85 90 95

Phe Ala Lys Tyr Ile Pro Val Lys Ser Lys Asn Ile Arg Val Ala Val
 100 105 110

Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Arg Leu Tyr
 115 120 125

Gly Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile Asp Phe Cys Glu Asp Asn Ala
 130 135 140

Glu Ile Val Pro Ala Thr Lys Trp Asp Ser Ala Ala Ile Gln Tyr Phe
 145 150 155 160

Gln Asn Leu Leu Arg Ala Thr Thr Gln Val Glu Ala Lys Leu Cys Ala
 165 170 175
 Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr Leu Tyr Ala Thr Ile Lys Asn
 180 185 190
 Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu Val Ala Lys Asn Phe Ala Tyr
 195 200 205
 Tyr Val Ser Pro Met Gly Asn Lys Asn Leu Asn Pro Leu Glu Lys Pro
 210 215 220
 Arg Gln Ser Leu Asn Ser Val Thr Cys Ser Ser Lys Leu Ser Pro Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Leu Trp Pro Met Leu Leu Gln Gly Lys Asp Tyr His Arg Met
 245 250 255
 Glu Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Lys Asp Ser Leu Thr Asp Ser Pro Lys
 260 265 270
 Met Met Leu Glu Lys Gln Gln Ser Leu Pro Leu Lys His Thr Glu
 275 280 285
 Lys Cys Thr Glu Ser Ser Val Tyr Trp Pro Thr Lys Arg Gly Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Ser Val Ser Gly Ser Ser Gln Arg
 305 310 315 320
 Pro Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr Glu Lys Lys Asp Cys Asp Glu
 325 330 335
 Lys Asn Gly Cys Val Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu
 340 345 350
 Arg Ala Asp Gly Thr Ser Asp Leu His Gln Leu Gln Lys Val Lys Leu
 355 360 365
 Gly Thr Leu Gln Pro Gly Val Val Leu Arg Asn Arg Ile Glu Pro Cys
 370 375 380
 Leu Thr Leu Glu Lys Ser Pro Leu Ser Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn
 385 390 395 400
 Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser
 405

<210> 29
<211> 1301
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (97)..(1167)

<400> 29
ttacagattg aagatccagg ttgcttctgg gttattataa aagggtgttag tccctttta 60

gatcatgatg tcgattatca aaaattaaat agtgcc atg aat gac ttc tac aac 114
Met Asn Asp Phe Tyr Asn
1 5

agc acg tgt caa gat ata gaa ata aaa ccc tta aca ttg gaa gaa gga 162
Ser Thr Cys Gln Asp Ile Glu Ile Lys Pro Leu Thr Leu Glu Glu Gly
10 15 20

cag gtg tgt gtg gtc tat tgt gag gag cta aag tgc tgg tgc agg gcc 210
Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Glu Glu Leu Lys Cys Trp Cys Arg Ala
25 30 35

att gtc aaa tca att acg tct tcc gca gac cag tac ctg gca gaa tgt 258
Ile Val Lys Ser Ile Thr Ser Ser Ala Asp Gln Tyr Leu Ala Glu Cys
40 45 50

ttc ctt gtg gac ttt gcc aag aac att cca gtc aaa tct aaa agc atc 306
Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Asn Ile Pro Val Lys Ser Lys Ser Ile
55 60 65 70

cga gtt gta gta gaa tcg ttt atg cag ctt ccc tat aga gca aaa aaa 354
Arg Val Val Val Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg Ala Lys Lys
75 80 85

ttc agc ctg tac tgc aca aag cct gtc aca tta cac att gac ttc tgc 402
Phe Ser Leu Tyr Cys Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile Asp Phe Cys
90 95 100

cga gac agt act gac att gtg cct gcc aag aag tgg gac aat gca gct 450
Arg Asp Ser Thr Asp Ile Val Pro Ala Lys Lys Trp Asp Asn Ala Ala
105 110 115

att cag tac ttt cag aac ctt ctg aaa gca act acc cag gtg gaa gcc 498
Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Lys Ala Thr Thr Gln Val Glu Ala
120 125 130

aga tta tgt gct gtg gaa gaa gat aca ttt gag gtt tac ctt tat gta 546
Arg Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr Leu Tyr Val

135	140	145	150	
act ata aaa gat gaa aaa gtt tgt gtt aat gat gat ctt gtt gca aag				594
Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu Val Ala Lys				
155	160		165	
aac tat gct tgt tat atg tca cct aca aag aat aaa aac ctt gat tat				642
Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys Asn Lys Asn Leu Asp Tyr				
170	175		180	
tta gaa aaa cca aga ttg aat ata aaa tca gca ccc tcc ttc aat aaa				690
Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser Ala Pro Ser Phe Asn Lys				
185	190		195	
ctc aat cca gca ctt aca ctc tgg cca atg ttt ttg caa gga aaa gat				738
Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met Phe Leu Gln Gly Lys Asp				
200	205		210	
gtt caa gga atg gaa gat tca cat ggt gta aat ttt ccg gca caa tct				786
Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val Asn Phe Pro Ala Gln Ser				
215	220		225	230
ctg caa cat aca tgg tgc aag ggt att gtc ggt gac ctc agg cca aca				834
Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val Gly Asp Leu Arg Pro Thr				
235	240		245	
gcc aca gca cag gac aaa gct gta aaa tgt aat atg gat tca ttg aga				882
Ala Thr Ala Gln Asp Lys Ala Val Lys Cys Asn Met Asp Ser Leu Arg				
250	255		260	
gat tca cct aaa gac aaa tct gaa aag aaa cac cat tgc atc tct tta				930
Asp Ser Pro Lys Asp Lys Ser Glu Lys Lys His His Cys Ile Ser Leu				
265	270		275	
aaa gat aca aat aag cgt gtt gaa tcc tca gtg tac tgg cca gca aaa				978
Lys Asp Thr Asn Lys Arg Val Glu Ser Ser Val Tyr Trp Pro Ala Lys				
280	285		290	
aga ggc ata acc ata tat gct gat cca gat gta cca gaa gca agt gct				1026
Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Glu Ala Ser Ala				
295	300		305	310
tta agt cag aag tca aat gag aaa cct ctt aga ttg act gag aag aaa				1074
Leu Ser Gln Lys Ser Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr Glu Lys Lys				
315	320		325	
gaa tat gat gag aat agc tgt gtg aaa tta ctg cag ttt tta aat				1122
Glu Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Cys Val Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asn				
330	335		340	

cct gat cct ttg aga gct gac gga atc tct gat ctc cag cag act 1167
 Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Ile Ser Asp Leu Gln Gln Thr
 345 350 355

tgagattaga agagaaaactc ctttagatggg ggacttaacc tgaagacatc ctttttagaaa 1227
 cgatcgaatg gattgttgct tctgagaaat tgcccttgt ttttggata ataaacgatc 1287
 ttcctttgg taaa 1301

<210> 30
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Thr Cys Gln Asp Ile Glu Ile Lys Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Glu Glu Gly Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Glu Glu Leu
 20 25 30

Lys Cys Trp Cys Arg Ala Ile Val Lys Ser Ile Thr Ser Ser Ala Asp
 35 40 45

Gln Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Asn Ile Pro
 50 55 60

Val Lys Ser Lys Ser Ile Arg Val Val Val Glu Ser Phe Met Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Ser Leu Tyr Cys Thr Lys Pro Val Thr
 85 90 95

Leu His Ile Asp Phe Cys Arg Asp Ser Thr Asp Ile Val Pro Ala Lys
 100 105 110

Lys Trp Asp Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Lys Ala
 115 120 125

Thr Thr Gln Val Glu Ala Arg Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe
 130 135 140

Glu Val Tyr Leu Tyr Val Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn
 145 150 155 160

Asp Asp Leu Val Ala Lys Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys
 165 170 175

Asn Lys Asn Leu Asp Tyr Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser
 180 185 190

 Ala Pro Ser Phe Asn Lys Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met
 195 200 205

 Phe Leu Gln Gly Lys Asp Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val
 210 215 220

 Asn Phe Pro Ala Gln Ser Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val
 225 230 235 240

 Gly Asp Leu Arg Pro Thr Ala Thr Ala Gln Asp Lys Ala Val Lys Cys
 245 250 255

 Asn Met Asp Ser Leu Arg Asp Ser Pro Lys Asp Lys Ser Glu Lys Lys
 260 265 270

 His His Cys Ile Ser Leu Lys Asp Thr Asn Lys Arg Val Glu Ser Ser
 275 280 285

 Val Tyr Trp Pro Ala Lys Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp
 290 295 300

 Val Pro Glu Ala Ser Ala Leu Ser Gln Lys Ser Asn Glu Lys Pro Leu
 305 310 315 320

 Arg Leu Thr Glu Lys Lys Glu Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Cys Val Lys
 325 330 335

 Leu Leu Gln Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Ile Ser
 340 345 350

 Asp Leu Gln Gln Thr
 355

<210> 31
 <211> 1280
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (122)..(1219)

<400> 31
 tgaggggctg agaagagagc aattcacact tgattagctc ccaggctcct gaattgagca 60

gaggaggcta	gaccgctgag	ctgcgcaccc	cagaggctgc	tctaccctgg	ctcagacgac	120															
c	atg	cag	cct	tat	caa	cg	ctt	ctg	g	cg	ctt	gg	tc	tt	ct	ctg	t	ta	ac	169	
	Met	Gln	Pro	Tyr	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Thr					
	1		5						10								15				
ctg	ccc	tgg	ggc	cag	aca	tcc	gag	ttt	caa	gac	tct	gac	ctt	ttg	cag		217				
Leu	Pro	Trp	Gly	Gln	Thr	Ser	Glu	Phe	Gln	Asp	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln						
	20				25										30						
ttt	ctg	gga	tta	gag	aaa	g	cg	cct	tca	cct	ca	agg	ttc	caa	cct	gtg		265			
Phe	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Ala	Pro	Ser	Pro	His	Arg	Phe	Gln	Pro	Val						
	35			40						45											
cct	cgc	gtc	tta	agg	aaa	atc	atc	cg	gct	cga	gaa	gcc	gct	gca	gcc		313				
Pro	Arg	Val	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala						
	50			55						60											
agt	ggg	gcc	tcg	cag	gac	tta	tgc	tac	gtg	aag	gag	ctg	ggt	gtt	cgt		361				
Ser	Gly	Ala	Ser	Gln	Asp	Leu	Cys	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Arg						
	65			70					75					80							
ggg	aac	ctg	ctt	cag	ctt	ctc	cca	gac	cag	ggt	ttt	ttc	ctt	aat	aca		409				
Gly	Asn	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Asp	Gln	Gly	Phe	Phe	Leu	Asn	Thr						
	85			90						95											
cag	aaa	cct	ttc	caa	gat	ggc	tcc	tgt	ctc	cag	aag	gtc	ctc	tat	ttt		457				
Gln	Lys	Pro	Phe	Gln	Asp	Gly	Ser	Cys	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Tyr	Phe						
	100			105						110											
aac	ttg	tct	gcc	atc	aaa	gaa	aag	gca	aag	ttg	acc	atg	gcc	cag	ctg		505				
Asn	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Met	Ala	Gln	Leu						
	115			120						125											
act	cta	gac	ttg	ggg	ccc	agg	tcc	tac	tat	aac	ctg	cga	cca	gag	ctg		553				
Thr	Leu	Asp	Leu	Gly	Pro	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Arg	Pro	Glu	Leu						
	130			135						140											
gtg	gtt	gct	ctg	tct	gtg	gtt	cag	gac	cg	gg	gg	gt	tg	gg	cg	tcc	601				
Val	Val	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Gln	Asp	Arg	Gly	Val	Trp	Gly	Arg	Ser						
	145			150						155			160								
cac	cct	aag	gt	gg	ag	tt	tt	ct	tt	ct	cg	tct	gt	cct	gg	cct	649				
His	Pro	Lys	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	Pro						
	165			170						175											
caa	ggt	cag	ctc	cag	ttc	aac	ctg	cag	ggt	gc	ctt	aag	gat	tgg	agc		697				
Gln	Gly	Gln	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Trp	Ser						
	180			185						190											

agc aac cga ctg aag aat ttg gac tta cac tta gag att ttg gtc aaa	745
Ser Asn Arg Leu Lys Asn Leu Asp Leu His Leu Glu Ile Leu Val Lys	
195 200 205	
gag gac aga tac tcc agg gta act gtc cag ccc gag aac ccc tgt gac	793
Glu Asp Arg Tyr Ser Arg Val Thr Val Gln Pro Glu Asn Pro Cys Asp	
210 215 220	
ccg ctg ctc cgc tct cta cat gcc tcg ctg gtg gta acc ctc aat	841
Pro Leu Leu Arg Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn	
225 230 235 240	
cct aaa cac tgt cat cct tct tcc aga aaa agg agg gcg gcc atc tct	889
Pro Lys His Cys His Pro Ser Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Ser	
245 250 255	
gtc ccc aag ggt ttc tgt agg aac ttc tgc cac cgt cat cag ctg ttc	937
Val Pro Lys Gly Phe Cys Arg Asn Phe Cys His Arg His Gln Leu Phe	
260 265 270	
atc aac ttc cag gac ctg ggt tgg cac aag tgg gtc atc gcc cct aag	985
Ile Asn Phe Gln Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Val Ile Ala Pro Lys	
275 280 285	
ggg ttc atg gca aat tac tgt cat gga gag tgc ccc ttc tca atg acc	1033
Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Met Thr	
290 295 300	
acg tat tta aat agt tcc aat tat gct ttc atg cag gct ctg atg cat	1081
Thr Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His	
305 310 315 320	
atg gct gac ccc aag gtc ccc aag gct gtc tgt gtc ccc acc aag ctc	1129
Met Ala Asp Pro Lys Val Pro Lys Ala Val Cys Val Pro Thr Lys Leu	
325 330 335	
tcg ccc atc tcc atg ctc tat cag gat agt gat aag aac gtc att ctc	1177
Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Ser Asp Lys Asn Val Ile Leu	
340 345 350	
cga cat tat gaa gac atg gta gtc gat gag tgt ggg tgt ggg	1219
Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly	
355 360 365	
tagtctcgaa actaggctag gagtgtgctt agggtaatac ctttaataaa actaccaccc	1279
c	1280

<211> 366

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Met	Gln	Pro	Tyr	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Thr
1															15

Leu	Pro	Trp	Gly	Gln	Thr	Ser	Glu	Phe	Gln	Asp	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln
															30
20															

Phe	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Ala	Pro	Ser	Pro	His	Arg	Phe	Gln	Pro	Val
															45
35															

Pro	Arg	Val	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala
															60
50															

Ser	Gly	Ala	Ser	Gln	Asp	Leu	Cys	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Arg
															80
65															

Gly	Asn	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Asp	Gln	Gly	Phe	Phe	Leu	Asn	Thr
															95
85															

Gln	Lys	Pro	Phe	Gln	Asp	Gly	Ser	Cys	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Tyr	Phe
															110
100															

Asn	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Met	Ala	Gln	Leu
															125
115															

Thr	Leu	Asp	Leu	Gly	Pro	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Arg	Pro	Glu	Leu
															140
130															

Val	Val	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Gln	Asp	Arg	Gly	Val	Trp	Gly	Arg	Ser
															160
145															

His	Pro	Lys	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	Pro
															175
165															

Gln	Gly	Gln	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Trp	Ser
															190
180															

Ser	Asn	Arg	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Leu	His	Leu	Glu	Ile	Leu	Val	Lys
															205
195															

Glu	Asp	Arg	Tyr	Ser	Arg	Val	Thr	Val	Gln	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Asp
															220
210															

Pro	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Asn
															240
225															

Pro Lys His Cys His Pro Ser Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Ser
245 250 255

Val Pro Lys Gly Phe Cys Arg Asn Phe Cys His Arg His Gln Leu Phe
260 265 270

Ile Asn Phe Gln Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Val Ile Ala Pro Lys
275 280 285

Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Met Thr
290 295 300

Thr Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His
305 310 315 320

Met Ala Asp Pro Lys Val Pro Lys Ala Val Cys Val Pro Thr Lys Leu
325 330 335

Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Ser Asp Lys Asn Val Ile Leu
340 345 350

Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly
355 360 365

<210> 33

<211> 1224

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (37)..(1128)

<400> 33

ggagctctcc ccggctctgac agccactcca gaggcc atg ctt cgt ttc ttg cca 54
Met Leu Arg Phe Leu Pro
1 5

gat ttg gct ttc agc ttc ctg tta att ctg gct ttg ggc cag gca gtc 102
Asp Leu Ala Phe Ser Phe Leu Leu Ile Leu Ala Leu Gly Gln Ala Val
10 15 20

caa ttt caa gaa tat gtc ttt ctc caa ttt ctg ggc tta gat aag gcg 150
Gln Phe Gln Glu Tyr Val Phe Leu Gln Phe Leu Gly Leu Asp Lys Ala
25 30 35

cct tca ccc cag aag ttc caa cct gtg cct tat atc ttg aag aaa att 198
Pro Ser Pro Gln Lys Phe Gln Pro Val Pro Tyr Ile Leu Lys Lys Ile

40	45	50	
ttc cag gat cgc gag gca gca gcg acc act ggg gtc tcc cga gac tta Phe Gln Asp Arg Glu Ala Ala Ala Thr Thr Gly Val Ser Arg Asp Leu			246
55	60	65	70
tgc tac gta aag gag ctg ggc gtc cgc ggg aat gta ctt cgc ttt ctc Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg Gly Asn Val Leu Arg Phe Leu			294
75	80		85
cca gac caa ggt ttc ttt ctt tac cca aag aaa att tcc caa gct tcc Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Tyr Pro Lys Lys Ile Ser Gln Ala Ser			342
90	95		100
tcc tgc ctg cag aag ctc ctc tac ttt aac ctg tct gcc atc aaa gaa Ser Cys Leu Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu			390
105	110		115
agg gaa cag ttg aca ttg gcc cag ctg ggc ctg gac ttg ggg ccc aat Arg Glu Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Gly Leu Asp Leu Gly Pro Asn			438
120	125		130
tct tac tat aac ctg gga cca gag ctg gaa ctg gct ctg ttc ctg gtt Ser Tyr Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu Leu Ala Leu Phe Leu Val			486
135	140		150
cag gag cct cat gtg tgg ggc cag acc acc cct aag cca ggt aaa atg Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Pro Lys Pro Gly Lys Met			534
155	160		165
ttt gtg ttg cgg tca gtc cca tgg cca caa ggt gct gtt cac ttc aac Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln Gly Ala Val His Phe Asn			582
170	175		180
ctg ctg gat gta gct aag gat tgg aat gac aac ccc cgg aaa aat ttc Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp Asn Pro Arg Lys Asn Phe			630
185	190		195
ggg tta ttc ctg gag ata ctg gtc aaa gaa gat aga gac tca ggg gtg Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu Asp Arg Asp Ser Gly Val			678
200	205		210
aat ttt cag cct gaa gac acc tgt gcc aga cta aga tgc tcc ctt cat Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg Leu Arg Cys Ser Leu His			726
215	220		230
gct tcc ctg ctg gtg act ctc aac cct gat cag tgc cac cct tct Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro Asp Gln Cys His Pro Ser			774
235	240		245

cgaaaggaga gca gcc atc cct gtc ccc aag ctt tct tgt aag aac	822
Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro Lys Leu Ser Cys Lys Asn	
250 255 260	
ctc tgc cac cgt cac cag cta ttc att aac ttc cg gac ctg ggt tgg	870
Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn Phe Arg Asp Leu Gly Trp	
265 270 275	
cac aag tgg atc att gcc ccc aag ggg ttc atg gca aat tac tgc cat	918
His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His	
280 285 290	
gga gag tgt ccc ttc tca ctg acc atc tct ctc aac agc tcc aat tat	966
Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser Leu Asn Ser Ser Asn Tyr	
295 300 305 310	
gct ttc atg caa gcc ctg atg cat gcc gtt gac cca gag atc ccc cag	1014
Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val Asp Pro Glu Ile Pro Gln	
315 320 325	
gct gtg tgt atc ccc acc aag ctg tct ccc att tcc atg ctc tac cag	1062
Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln	
330 335 340	
gac aat aat gac aat gtc att cta cga cat tat gaa gac atg gta gtc	1110
Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val	
345 350 355	
gat gaa tgt ggg tgt ggg tagatgtca gaaatggaa tagaaggagt	1158
Asp Glu Cys Gly Cys Gly	
360	
gttcttaggg taaatcttt aataaaacta cctatcttgt ttatgaccac ttagatcgaa	1218
atgtca	1224

<210> 34
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Met Leu Arg Phe Leu Pro Asp Leu Ala Phe Ser Phe Leu Leu Ile Leu
 1 . 5 10 15
 Ala Leu Gly Gln Ala Val Gln Phe Gln Glu Tyr Val Phe Leu Gln Phe
 20 25 30
 Leu Gly Leu Asp Lys Ala Pro Ser Pro Gln Lys Phe Gln Pro Val Pro

35	40	45
Tyr Ile Leu Lys Lys Ile Phe Gln Asp Arg Glu Ala Ala Ala Thr Thr		
50	55	60
Gly Val Ser Arg Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg Gly		
65	70	75
Asn Val Leu Arg Phe Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Tyr Pro Lys		
85	90	95
Lys Ile Ser Gln Ala Ser Ser Cys Leu Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn		
100	105	110
Leu Ser Ala Ile Lys Glu Arg Glu Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Gly		
115	120	125
Leu Asp Leu Gly Pro Asn Ser Tyr Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu		
130	135	140
Leu Ala Leu Phe Leu Val Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Thr		
145	150	155
160		
Pro Lys Pro Gly Lys Met Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln		
165	170	175
Gly Ala Val His Phe Asn Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp		
180	185	190
Asn Pro Arg Lys Asn Phe Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu		
195	200	205
Asp Arg Asp Ser Gly Val Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg		
210	215	220
Leu Arg Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro		
225	230	235
240		
Asp Gln Cys His Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro		
245	250	255
Lys Leu Ser Cys Lys Asn Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn		
260	265	270
Phe Arg Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe		
275	280	285
Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser		
290	295	300

Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val
 305 310 315 320

Asp Pro Glu Ile Pro Gln Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro
 325 330 335

Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Asn Asn Asn Val Ile Leu Arg His
 340 345 350

Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly
 355 360

<210> 35

<211> 1248

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (32)..(1003)

<400> 35

agtggatccc ccgggctgca ggaattccgg g atg gat cct cga acc tgg cta 52
 Met Asp Pro Arg Thr Trp Leu
 1 5

agc ttc caa ggg cct cca ggt ggg cct gga atc gga cca ggc tca gag 100
 Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu
 10 15 20

gta ttg ggg atc tcc cca tgt ccg ccc gca tac gag ttc tgc gga ggg 148
 Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly
 25 30 35

atg gca tac tgt gga cct cag gtt ggt ctg ggc cta gtc ccc caa gtt 196
 Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Leu Gly Leu Val Pro Gln Val
 40 45 50 55

ggc gtg gag act ttg cag cct gag ggc cag gca gga gca cga gtg gaa 244
 Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu
 60 65 70

agc aac tca gag gga acc tcc tct gag ccc tgt gcc gac cgc ccc aat 292
 Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn
 75 80 85

gcc gtg aag ttg gag aag gtg gaa cca act ccc gag gag tcc cag gac 340
 Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp

90	95	100	
atg aaa gcc ctg cag aag gag cta gaa cag ttt gcc aag ctg ctg aag Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys 105 110 115			388
cag aag agg atc acc ttg ggg tac acc cag gcc gac gtg ggg ctc acc Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr 120 125 130 135			436
ctg ggc gtt ctc ttt gga aag gtg ttc agc cag acc acc atc tgt cgc Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg 140 145 150			484
ttc gag gcc ttg cag ctc agc ctt aag aac atg tgt aag ctg cgg ccc Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro 155 160 165			532
ctg ctg gag aag tgg gtg gag gaa gcc gac aac aat gag aac ctt cag Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln 170 175 180			580
gag ata tgc aaa tcg gag acc ctg gtg cag gcc cgg aag aga aag cga Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg 185 190 195			628
act agc att gag aac cgt gtg agg tgg agt ctg gag acc atg ttt ctg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu 200 205 210 215			676
aag tgc ccg aag ccc tcc cta cag cag atc act cac atc gcc aat cag Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln Ile Thr His Ile Ala Asn Gln 220 225 230			724
ctt ggg cta gag aag gat gtg gtt cga gta tgg ttc tgt aac cgg cgc Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg 235 240 245			772
cag aag ggc aaa aga tca agt att gag tat tcc caa cga gaa gag tat Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr 250 255 260			820
gag gct aca ggg aca cct ttc cca ggg ggg gct gta tcc ttt cct ctg Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu 265 270 275			868
ccc cca ggt ccc cac ttt ggc acc cca ggc tat gga agc ccc cac ttc Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe 280 285 290 295			916

acc aca ctc tac tca gtc cct ttt cct gag ggc gag gcc ttt ccc tct 964
 Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser
 300 305 310

gtt ccc gtc act gct ctg ggc tct ccc atg cat tca aac tgaggcacca 1013
 Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
 315 320

gccctccctg gggatgctgt gagccaaggc aaggaggta gacaagagaa cctggagctt 1073

tgggttaaa ttctttact gaggaggat taaaagcaca acaggggtgg ggggtggat 1133

ggggaaagaa gctcagtgtat gctgttgatc aggacctgg cctgtctgtc actcatcatt 1193

ttgttcttaa ataaagactg ggacacacag taaaaaaaaa aaaaaaaaaac tcgag 1248

<210> 36

<211> 324

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Met Asp Pro Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Pro
 1 5 10 15

Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro
 20 25 30

Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly
 35 40 45

Leu Gly Leu Val Pro Gln Val Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly
 50 55 60

Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu
 65 70 75 80

Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro
 85 90 95

Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu
 100 105 110

Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr
 115 120 125

Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe
 130 135 140

Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys
 145 150 155 160
 Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Glu Ala
 165 170 175
 Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val
 180 185 190
 Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp
 195 200 205
 Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln
 210 215 220
 Ile Thr His Ile Ala Asn Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg
 225 230 235 240
 Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu
 245 250 255
 Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly
 260 265 270
 Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro
 275 280 285
 Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro
 290 295 300
 Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro
 305 310 315 320
 Met His Ser Asn

<210> 37
 <211> 1371
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (43)..(1122)

<400> 37
 ctcatttcac caggcccccg gcttgccgcg ctttccttcc cc atg gcg gga cac 54
 Met Ala Gly His

ctg gct tcg gat ttc gcc ttc tcg ccc cct cca ggt ggt gga ggt gat	102
Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Asp	
5 10 15 20	
ggg cca ggg ggg ccg gag ccg ggc tgg gtt gat cct cgg acc tgg cta	150
Gly Pro Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro Arg Thr Trp Leu	
25 30 35	
agc ttc caa ggc cct cct gga ggg cca gga atc ggg ccg ggg gtt ggg	198
Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Val Gly	
40 45 50	
cca ggc tct gag gtg tgg ggg att ccc cca tgc ccc ccg ccg tat gag	246
Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro Pro Pro Tyr Glu	
55 60 65	
ttc tgt ggg ggg atg gcg tac tgt ggg ccc cag gtt gga gtg ggg cta	294
Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Val Gly Leu	
70 75 80	
gtg ccc caa ggc ggc ttg gag acc tct cag cct gag ggc gaa gca gga	342
Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu Gly Glu Ala Gly	
85 90 95 100	
gtc ggg gtg gag agc aac tcc gat ggg gcc tcc ccg gag ccc tgc acc	390
Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro Glu Pro Cys Thr	
105 110 115	
gtc acc cct ggt gcc gtg aag ctg gag aag gag aag ctg gag caa aac	438
Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Asn	
120 125 130	
ccg gag gag tcc cag gac atc aaa gct ctg cag aaa gaa ctc gag caa	486
Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln	
135 140 145	
ttt gcc aag ctc ctg aag cag aag agg atc acc ctg gga tat aca cag	534
Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln	
150 155 160	
gcc gat gtg ggg ctc acc ctg ggg gtt cta ttt ggg aag gta ttc agc	582
Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser	
165 170 175 180	
caa acg acc atc tgc cgc ttt gag gct ctg cag ctt agc ttc aag aac	630
Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Phe Lys Asn	
185 190 195	

atg tgt aag ctg cgg ccc ttg ctg cag aag tgg gtg gag gaa gct gac	678
Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val Glu Glu Ala Asp	
200 205 210	
aac aat gaa aat ctt cag gag ata tgc aaa gca gaa acc ctc gtg cag	726
Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu Thr Leu Val Gln	
215 220 225	
gcc cga aag aga aag cga acc agt atc gag aac cga gtg aga ggc aac	774
Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Gly Asn	
230 235 240	
ctg gag aat ttg ttc ctg cag tgc ccg aaa ccc aca ctg cag cag atc	822
Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gln Ile	
245 250 255 260	
agc cac atc gcc cag cag ctt ggg ctc gag aag gat gtg gtc cga gtg	870
Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val	
265 270 275	
tgg ttc tgt aac cgg cgc cag aag ggc aag cga tca agc agc gac tat	918
Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Asp Tyr	
280 285 290	
gca caa cga gag gat ttt gag gct gct ggg tct cct ttc tca ggg gga	966
Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro Phe Ser Gly Gly	
295 300 305	
cca gtg tcc ttt cct ctg gcc cca ggg ccc cat ttt ggt acc cca ggc	1014
Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly	
310 315 320	
tat ggg agc cct cac ttc act gca ctg tac tcc tcg gtc cct ttc cct	1062
Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser Val Pro Phe Pro	
325 330 335 340	
gag ggg gaa gcc ttt ccc cct gtc tct gtc acc act ctg ggc tct ccc	1110
Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr Leu Gly Ser Pro	
345 350 355	
atg cat tca aac tgagggtgcct gcccttctag gaatggggga cagggggagg	1162
Met His Ser Asn	
360	
ggaggagcta gggaaagaaa acctggagtt tgtgccaggg tttttggatt aagttcttca	1222
ttcactaagg aaggaattgg gaacacaaag ggtggggca gggagtttgg gggcaactgg	1282
ttggaggaa ggtgaagttc aatgatgctc ttgattttaa tcccacatca tgtatcactt	1342

ttttcttaaa taaagaagct tggacaca 1371

<210> 38

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro
20 25 30

Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly
35 40 45

Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro
50 55 60

Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val
65 70 75 80

Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu
85 90 95

Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro
100 105 110

Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys
115 120 125

Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys
130 135 140

Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly
165 170 175

Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
180 185 190

Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
195 200 205

Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu
210 215 220

Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg
 225 230 235 240
 Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr
 245 250 255
 Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp
 260 265 270
 Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser
 275 280 285
 Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro
 290 295 300
 Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe
 305 310 315 320
 Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser
 325 330 335
 Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr
 340 345 350
 Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
 355 360

<210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39
 agggctcgct actgagatgc tctg

24

<210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 40
aggcaggtct tcagaggaag ggcg 24

<210> 41
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 41
cgggctgttag acctgtctgc attctg 26

<210> 42
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 42
ggtccttctg tctcatcctc gagagt 26

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 43
accaaggtaa ccgcattcaa 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 44
cttcaccaag attccgatg 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 45
gaatgggtgga ctagctttg

20

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 46
tgccatgaat gtcgatatgc ag

22

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 47
ccgcggaaag tcaagagatt gggtgg

26

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 48
gcggccgcct ttacgggtca cgagggtcac

30

<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 49
tgtggccagt gtttggttct ggcggg

26

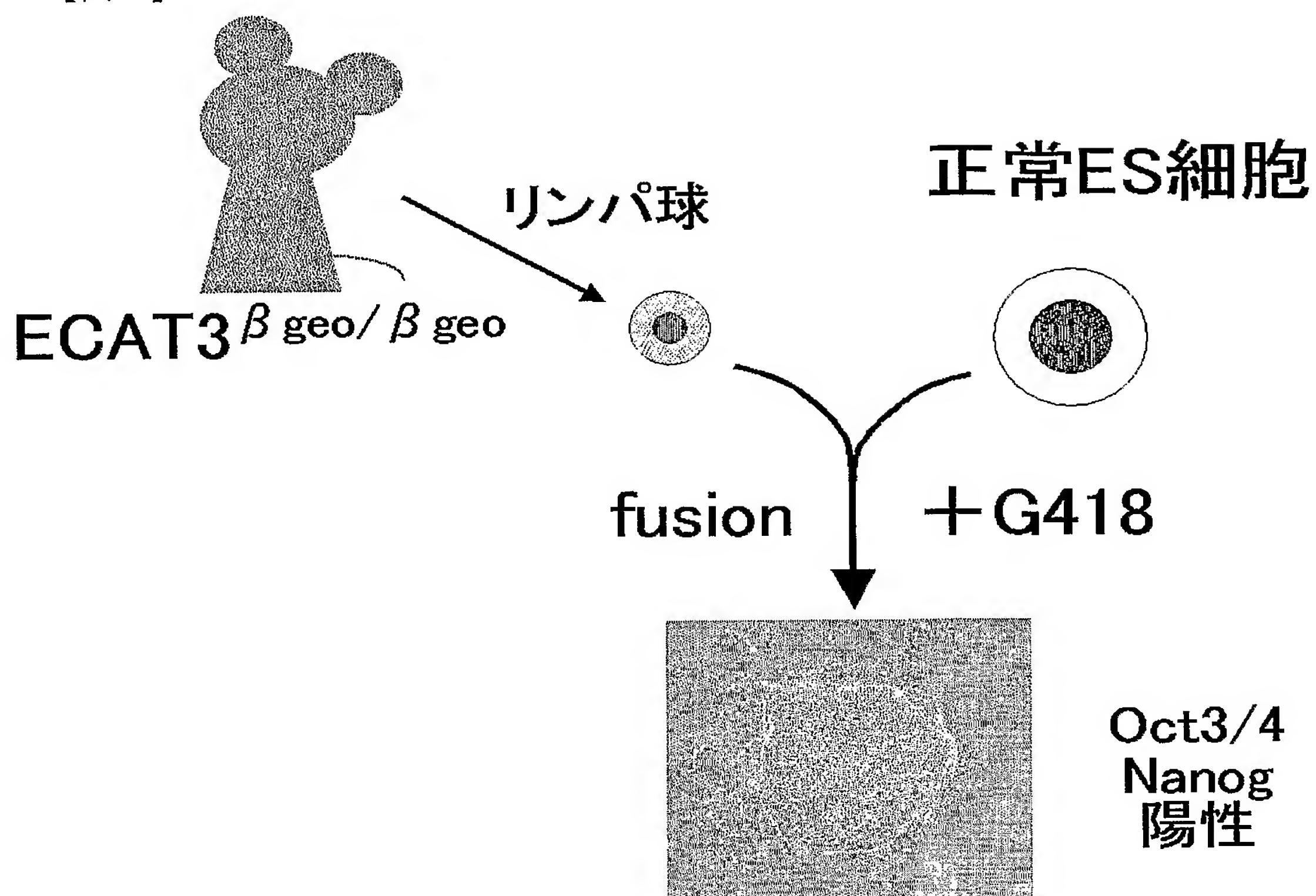
<210> 50
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

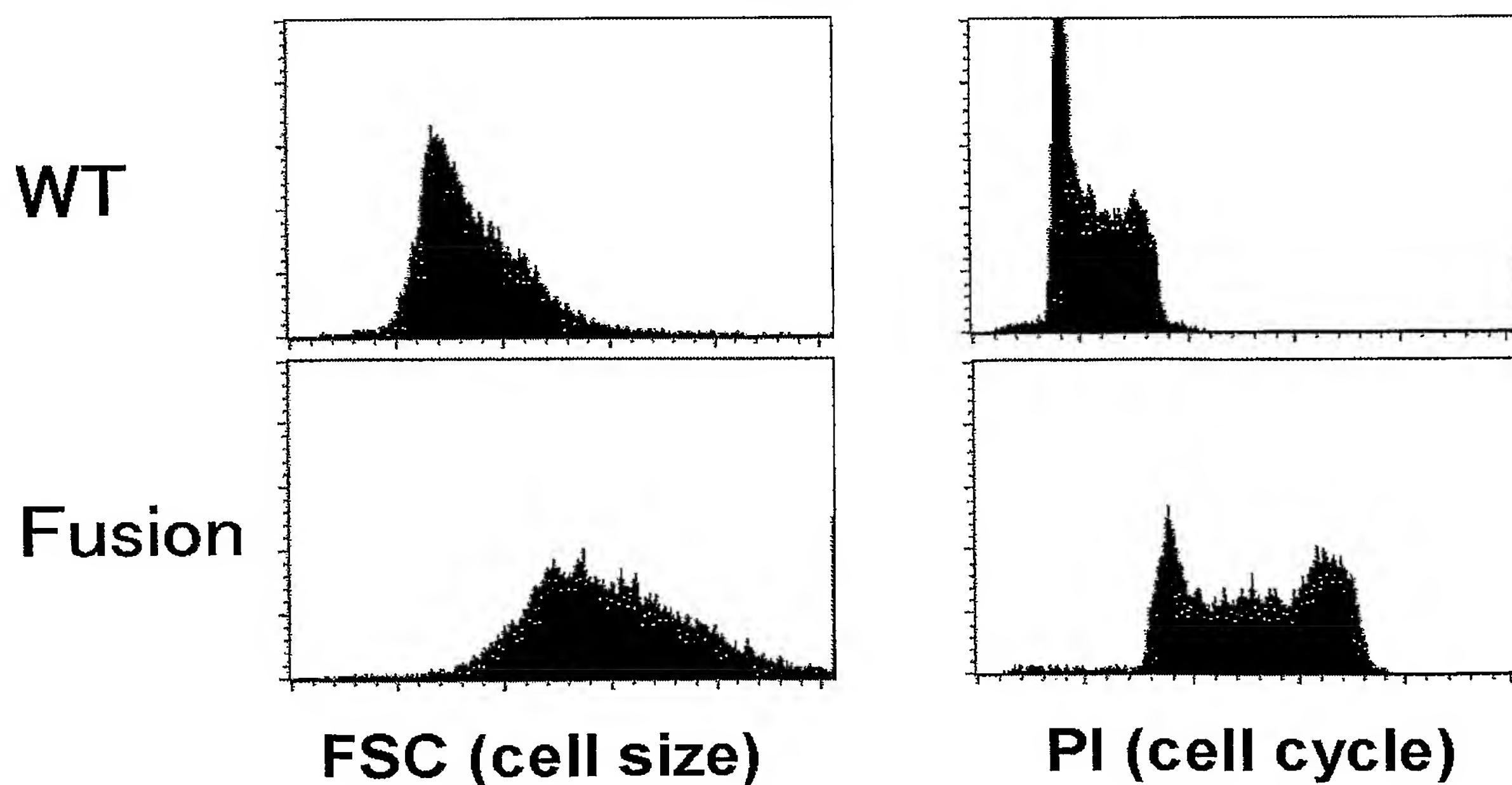
<400> 50
ctcgaggact cgccattcta gccaaag

26

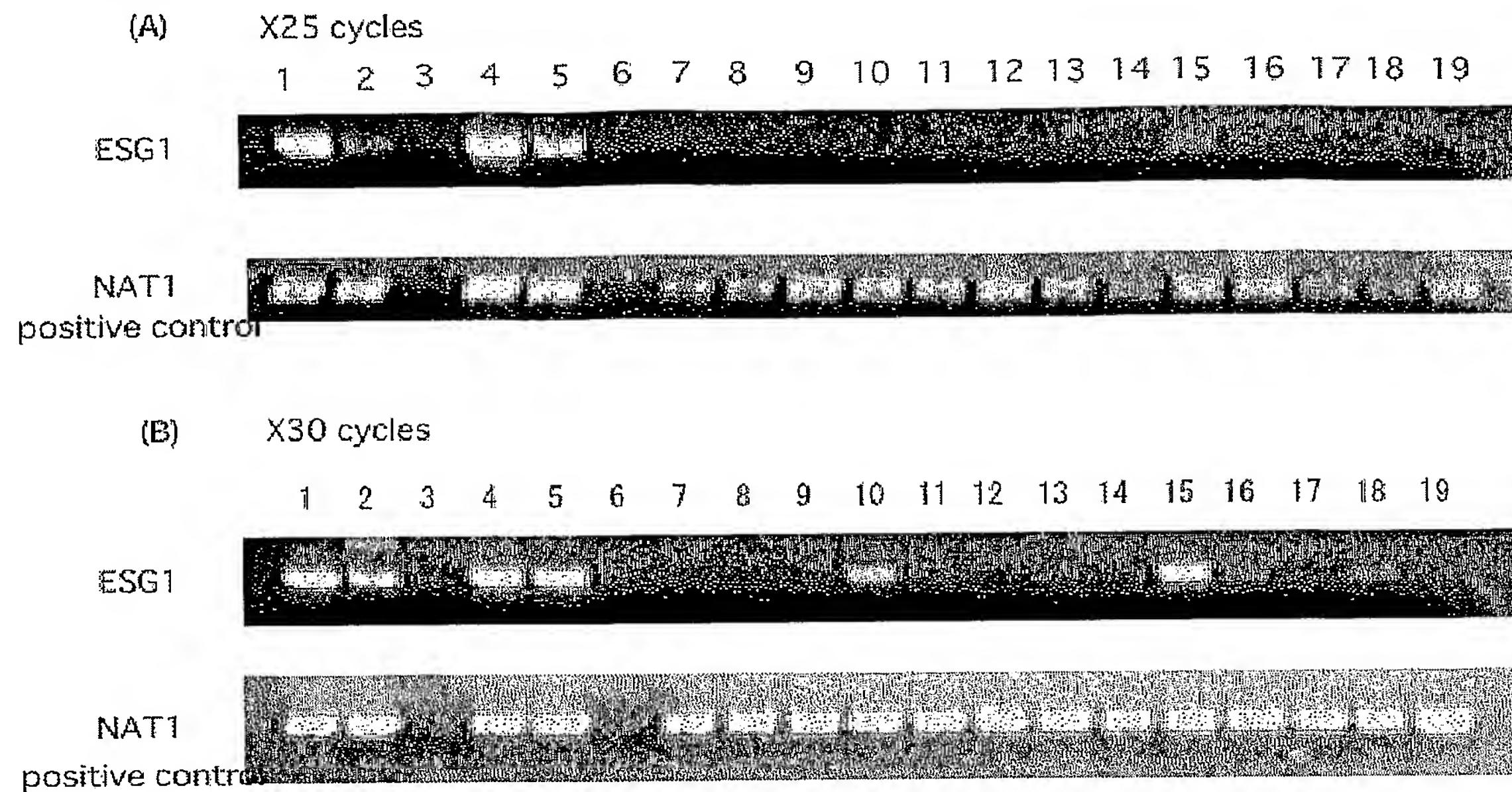
【書類名】図面
【図 1】



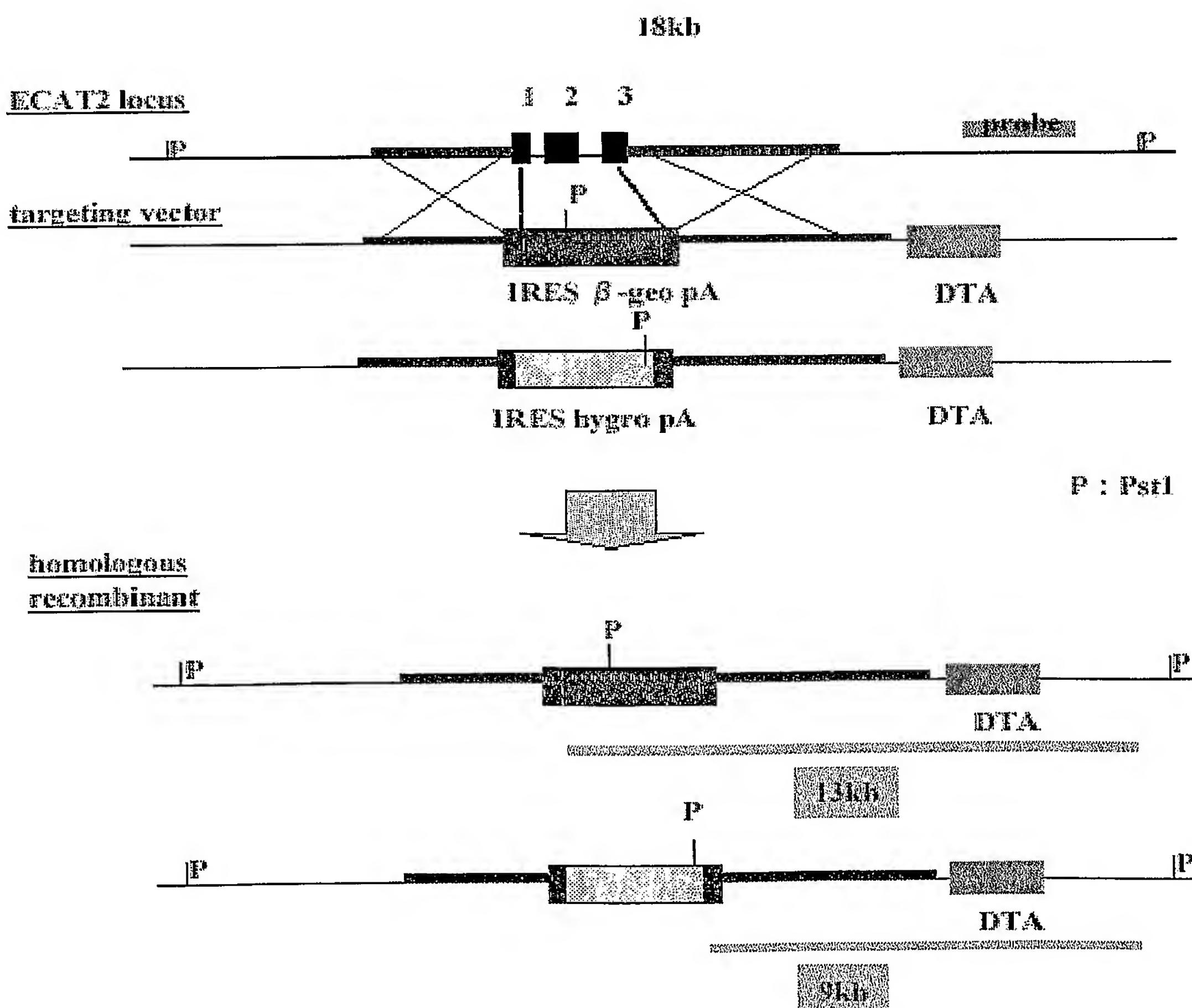
【図 2】



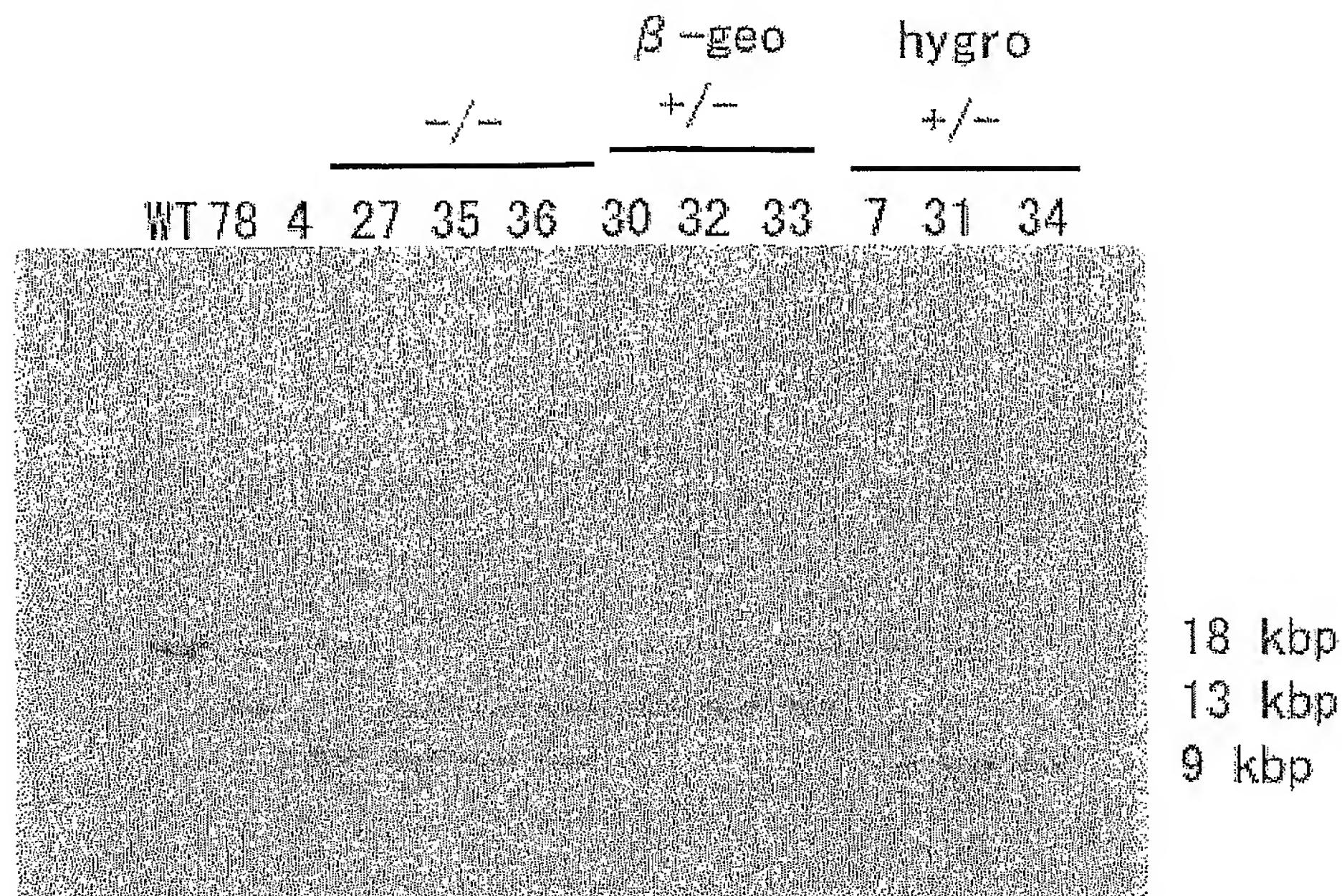
【図3】



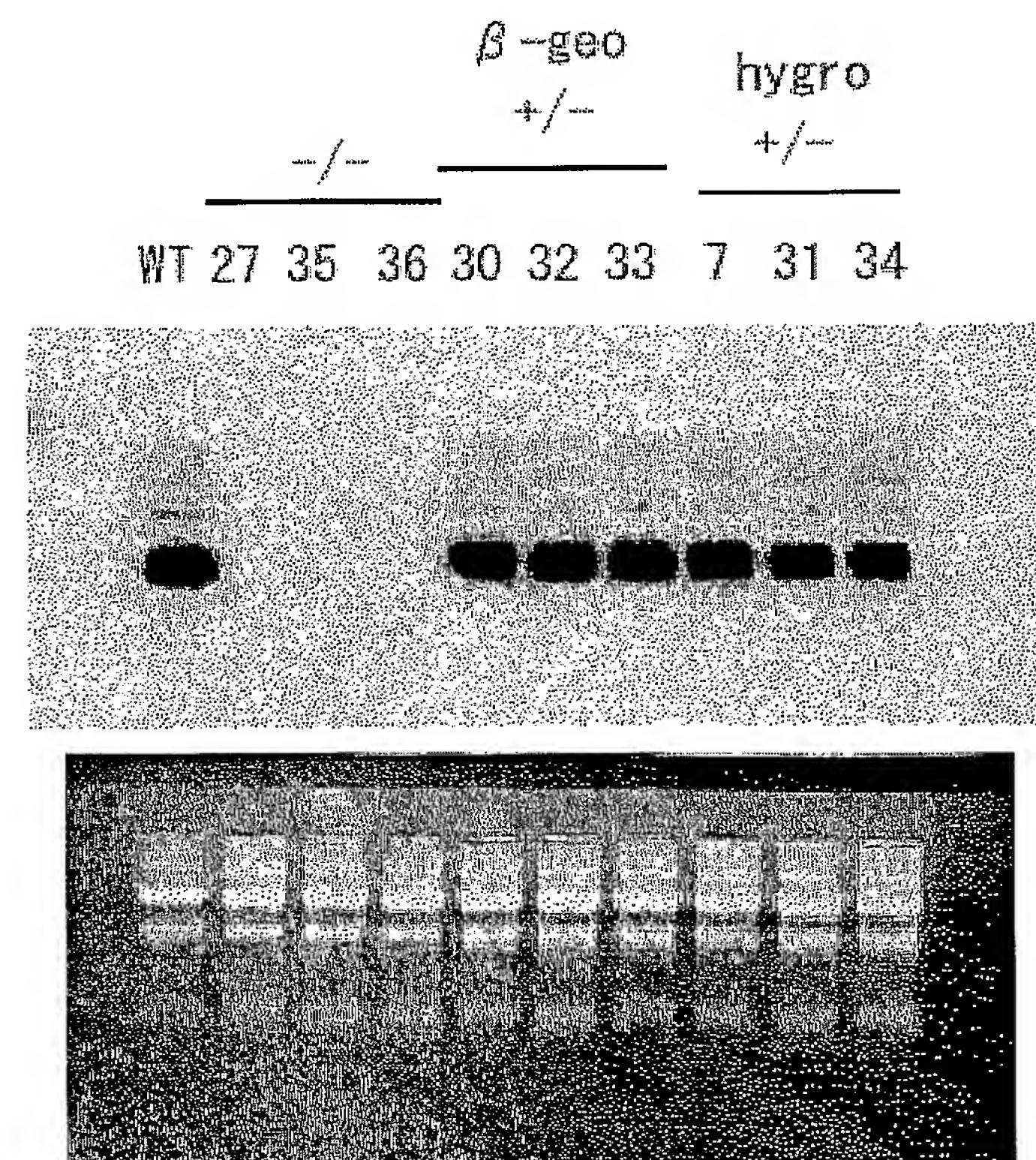
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 体細胞核初期化物質の新規なスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 (a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、および (b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法等。

【選択図】 なし

認定・付力口情幸良

特許出願の番号	特願2004-232961
受付番号	50401348130
書類名	特許願
担当官	篠川 友子 9482
作成日	平成16年 9月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 8月10日
-------	-------------

特願 2004-232961

出願人履歴情報

識別番号

[501219312]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2001年 5月31日

新規登録

大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝2-9-7-1401

山中 伸弥

特願 2 0 0 4 - 2 3 2 9 6 1

出願人履歴情報

識別番号

[0 0 0 1 8 3 3 7 0]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社